

---

# **Selbstregeneratives Potential bei hypertensiven Herzerkrankungen**

## **Inaugural – Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Charlotte Sonntag**

---



# **Selbstregeneratives Potential bei hypertensiven Herzerkrankungen**

## **Inaugural – Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Charlotte Sonntag**

aus Saarlouis

Gießen, 2015

Aus dem Physiologischen Institut der Justus – Liebig – Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. R. Schultz

Gutachter: Prof. Dr. Schlüter

Gutachter: PD Dr. Pöling

Tag der Disputation: 14.04.2016

*gewidmet*

*Josefa Barbara Sonntag*

*(10.06.1931)*

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Arterielle Hypertonie	1
1.1.1.	Definition	1
1.1.2.	Folgen	2
1.1.3.	Therapie	3
1.2.	Einflüsse auf die arterielle Hypertonie	5
1.2.1.	Körperliche Aktivität	5
1.2.2.	Medikamentöse Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron- Systems	6
1.3.	Herangezogene kardiale Marker zur Untersuchung eines selbst regenerativen Potentials	7
1.3.1.	Stammzell- und Differenzierungsmarker	7
1.3.2.	Marker für hypertrophe Umbauprozesse	9
1.3.3.	Marker für fibrotische Umbauprozesse	9
1.3.4.	Marker des Calciumhaushaltes	10
1.4.	Fragestellung dieser Arbeit	12
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
<b>2.1.</b>	<b>Material</b>	<b>13</b>
2.1.1.	Gewebeproben aus Versuchstieren	13
2.1.2.	Versuchsgeräte	13
2.1.3.	Verbrauchsmaterial	14
2.1.4.	Chemikalien	14
2.1.5.	Antikörper	17
2.1.6.	Primer	18
2.1.7.	Elektronische Datenverarbeitungsprogramme	20
<b>2.2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>21</b>
2.2.1.	Studiendesign	21
2.2.2.	Real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.2.2.1.	Durchführung	22

---

2.2.2.2.	Auswertung	24
2.2.2.3.	Zusammensetzung der eingesetzten Reagenzien	24
2.2.3.	Western Blot	24
2.2.3.1.	Durchführung	24
2.2.3.2.	Auswertung	26
2.2.3.3.	Zusammensetzung der eingesetzten Reagenzien	26
2.2.4.	Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Bestimmung der Plasmakonzentration von SDF-1 $\alpha$	27
2.2.4.1.	Durchführung	27
2.2.4.2.	Auswertung	28
2.2.5.	Stimulation isolierter Kardiomyozyten	29
2.2.5.1.	Durchführung	29
2.2.5.2.	Auswertung	31
2.2.5.3.	Zusammensetzung der eingesetzten Reagenzien	32
2.6	Statistik	34
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1.	Molekulare Adaptation im linken Ventrikel bei chronischer Druckbelastung: Vergleich männlicher spontan hypertensiver mit normotensiven Ratten	35
3.1.1	Expressionsänderungen etablierter kardialer Marker bei druckinduzierten Umbauprozessen am linken Ventrikel	35
3.1.2.	Expressionsänderungen von Stammzell- und Differenzierungsmarkern im linken Ventrikel bei männlichen spontan hypertensiven Ratten	36
3.1.3.	Expressionsänderungen von Stammzell- und Differenzierungsmarkern im linken Ventrikel bei männlichen spontan hypertensiven Ratten im zeitlichen Verlauf	37
3.2.	Molekulare Adaptation im linken Ventrikel bei chronischer Druckbelastung: Vergleich weiblicher spontan hypertensiver mit normotensiven Ratten	40
3.2.1.	Hypertrophiemodell bei weiblichen prähypertensiven Ratten	40

---

3.2.2.	Expressionsänderungen von Stammzell- und Differenzierungsmarkern im linken Ventrikel bei weiblichen spontan hypertensiven Ratten	41
3.2.3.	Expressionsänderungen von Stammzell- und Differenzierungsmarkern im linken Ventrikel bei weiblichen spontan hypertensiven Ratten im zeitlichen Verlauf	43
3.2.4.	Einfluss prohypertropher Stimulation auf die kardiale GATA-4-Expression	45
3.3.	Einfluss von körperlicher Aktivität und medikamentöser Blutdrucksenkung auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern bei weiblichen spontan hypertensiven Ratten	47
3.3.1.	Einfluss körperlicher Aktivität auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern	47
3.3.2.	Einfluss des ACE-Hemmers Captopril auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern	50
3.4.	Ergebnisse zur gewebespezifischen Lokalisation von SDF-1 $\alpha$ und weiterer induzierter Stammzell- und Differenzierungsmarker	52
3.4.1.	Vergleich isolierter Kardiomyozyten mit isolierten Nicht-Kardiomyozyten	52
3.4.2.	Nachweis von SDF-1 $\alpha$ im Plasma	55
3.4.3.	Vergleich der Expression von SDF-1 $\alpha$ an Niere und linkem Ventrikel	56
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1.	Beurteilung der Expressionsparameter der männlichen Tieren	57
4.2.	Beurteilung der Expressionsparameter der weiblichen Tieren	58
4.3.	Beurteilung des Einflusses von körperlicher Aktivität und medikamentöser Blutdrucksenkung auf die Expression der Stamm- und Differenzierungsmarker	60
4.3.1.	Körperliche Aktivität	60
4.3.2.	Medikamentöse Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems	60



---

4.4.	Beurteilung der Gewebespezifität von SDF-1 $\alpha$	62
4.5.	Schlussfolgerung	63
5.	<b>Zusammenfassung</b>	64
6.	<b>Summary</b>	65
7.	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	66
8.	<b>Darstellungsverzeichnis</b>	70
8.1.	Tabellenverzeichnis	70
8.2.	Abbildungsverzeichnis	70
9.	<b>Literaturverzeichnis</b>	72
10.	<b>Erklärung</b>	91
11.	<b>Veröffentlichung</b>	92
12.	<b>Danksagung</b>	93

# 1. Einleitung

## 1.1. Arterielle Hypertonie

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen in den Industrieländern weltweit und auch in Deutschland die häufigste Todesursache dar [World Health Organisation (WHO), 2011; Statistisches Bundesamt, 2012]. Ausgangspunkt ist oftmals eine arterielle Hypertonie, auf deren Grundlage sich in vielen Fällen eine Herzinsuffizienz entwickelt. Angesichts der geringen Symptomatik der arteriellen Hypertonie in der Anfangsphase sind sich viele Patienten ihrer Erkrankung nicht bewusst. Die steigende Prävalenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und den damit verbundenen Komplikationen führt zu häufigen Vorstellungsgründen in Hausarztpraxen und Krankenhäusern.

### 1.1.1. Definition

Die WHO definiert eine arterielle Hypertonie als eine „mehrmalige, unabhängig voneinander gemessene Blutdruckerhöhung mit einem systolischen Wert  $\geq 140$  mmHg oder einem diastolischen Wert  $\geq 90$  mmHg“. Nach den Leitlinien der European Society of Hypertension (ESH, 2007; überarbeitet 2013), der European Society of Cardiology (ESC, 2007) und der Deutschen Hochdruckliga (DHL, 2008) ist eine arterielle Hypertonie als „jene Blutdruckerhöhung definiert, ab welcher Diagnostik und Behandlung für den Patienten von Vorteil sind“. Dabei können folgende Kategorien unterschieden werden:

Kategorie	Systolischer Wert (mmHg)		Diastolischer Wert (mmHg)
Optimal	< 120	und	< 80
Normal	120-129	und /oder	80-84
Hoch-normal	130-139	und /oder	85-89
Hypertonie Grad 1	140-159	und /oder	90-99
Hypertonie Grad 2	160-179	und /oder	100-109
Hypertonie Grad 3	> 180	und /oder	>110
Isolierte systolische Hypertonie	> 140	und	<90

Tab.1.1.: Kategorien der arteriellen Hypertonie

Die arterielle Hypertonie kann in zwei Formen unterteilt werden:

Bei bis zu 90% der Patienten liegt eine primäre oder idiopathische Hypertonie vor. In diesem Fall kann keine organische Ursache für die Erhöhung des Blutdruckes gefunden werden. Man vermutet, dass mehrere Faktoren an der Entstehung beteiligt sind. So konnten eine positive Familienanamnese, Ernährungs- und Bewegungsverhalten, Stress, zunehmendes Alter und der sozioökonomische Status als Risikofaktoren bestimmt werden (de Araújo Rodrigues et al., 2015; do Prado Junior et al., 2015).

Bei der sekundären Hypertonie (10% der Fälle) wird die Erhöhung des Blutdruckes durch extrakardiale Erkrankungen bedingt. Als Beispiele können unter anderem folgende Erkrankungen genannt werden: Renale Hypertonien, ausgelöst durch Glomerulonephritiden oder eine diabetische Nephropathie, können über eine vermehrte Angiotensinogenausschüttung an der Entwicklung einer Hypertonie beteiligt sein (Navar, 2013; Satou et al., 2015). Endokrine Hypertonien, wie das Phäochromozytom und Morbus Cushing, können über vermehrte Katecholaminfreisetzungen ebenso die Entstehung einer sekundären Hypertonie anregen (Velasco, Vongpatanasin, 2014; Thomas et al., 2015). Bei Patienten mit einem Schlafapnoe-Syndrom führt eine nächtliche intermittierende Hypoxämie zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems, die über einen erhöhten adrenergen Tonus die Entstehung einer Hypertonie begünstigt (Phillips, Cistulli, 2006; Marcus et al., 2014).

### **1.1.2. Folgen**

Die Folgen der arteriellen Hypertonie sind vielfältig. Über die Aktivierung des Sympathikus und der Ausschüttung von Katecholaminen, deren Plasmalevel mit dem Risiko für ein akutes Myokardgeschehen und einen Schlaganfall korreliert, werden kardiale Umbauprozesse angeregt (Rorive et al. 1991; Peng et al., 2006; Grassi et al., 2010). Eine linksventrikuläre konzentrische Hypertrophie mit anschließender Dekompensation bildet den Ausgangspunkt für eine Herzinsuffizienz. Eine so genannte Makroangiopathie kann eine koronare Herzerkrankung begünstigen, welche Myokardischämien, Herzrhythmusstörungen und den plötzliche Herztod nach sich ziehen kann (Motz, 2006; Sultana et al., 2010; McCulloch, 2015). Durch die Erhöhung des peripheren Widerstandes entstehen Gefäßwandveränderungen, die eine frühzeitige Arteriosklerose bedingen und zu endothelialen Dysfunktionen führen (Plotnikova et al., 2015). Weiterhin wird die Bildung von Aneurysmen und damit die Gefahr einer Dissektion erleichtert (Zhang et al., 2015). Auswirkungen der arteriellen Hypertonie am Gehirn sind zerebrale Ischämien oder Massenblutungen, welche die Todesursache bei vielen

Patienten mit arterieller Hypertonie darstellen (Sato et al., 2015; Turin et al., 2015). An der Niere kann sich eine hypertensive Nephropathie mit nachfolgender Niereninsuffizienz entwickeln (Wang et al., 2013). Als weitere Komplikationen sind Veränderungen am Augenhintergrund und Plaquebildungen, v.a. in der A. carotis mit Gefahr eines thrombembolischen Apoplexes, zu nennen (Karaca et al., 2014). Einen akut lebensbedrohlichen Zustand stellt die hypertensive Krise dar. Diese beschreibt einen kritischen Blutdruckanstieg ( $\geq 230/130$  mmHg), der zu Organschäden führen kann (hypertensiver Notfall) und einer sofortiger Therapie bedarf (Skrzypczyk et al., 2013; Phan et al., 2015).

Für das Auftreten von kardiovaskulären Folgeereignissen kann ein 10-Jahre-Risiko bestimmt werden. Dafür werden verschiedene Risikofaktoren für die arterielle Hypertonie (u.a. Lebensalter, Geschlecht, Dyslipidämie) mit Diabetes mellitus als eigenem Risikofaktor und schon vorhandenen Organschäden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Im klinischen Alltag wird unter anderem der PROCAM-Kalkulator herangezogen, welcher tödliche und nicht-tödliche Ereignisse erfasst, sowie der ESC-Kalkulator, der ausschließlich tödliche Ereignisse erfasst (Gohlke, 2012).

### 1.1.3. Therapie

Das Ziel der Therapie bei einer arteriellen Hypertonie ist immer die langfristige Blutdrucknormalisierung, um das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen und weitere Schäden an anderen Organen zu minimieren. Dabei werden folgende Zielwerte angestrebt:

#### Zielblutdruckwerte

<140/90 mmHg	Generelles Therapieziel
130-139/80-85 mmHg	Bei Hochrisikopatienten (chron. Niereninsuffizienz, Koronare Herzerkrankung (KHK), Z. n. Apoplex, Diabetes mellitus)

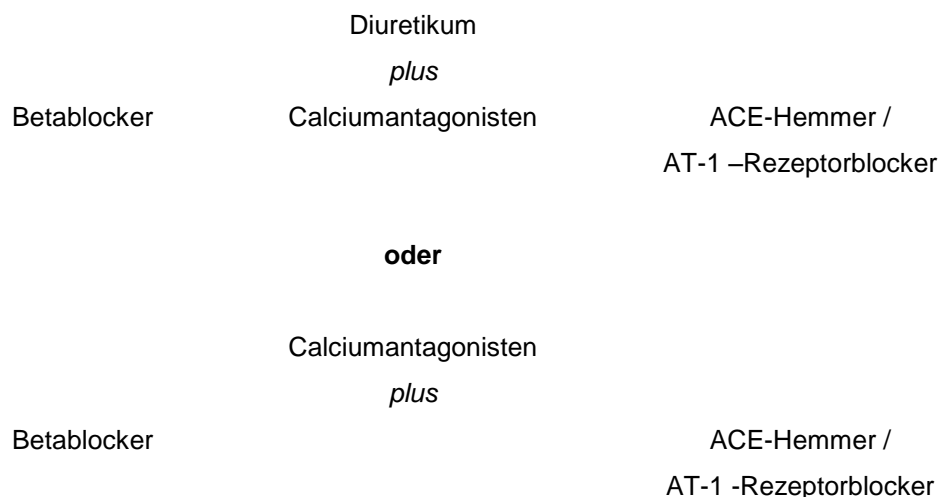
Tab. 1.2.: Zielblutdruckwerte für die arterielle Hypertonie, übernommen aus Innere Medizin, Herold, 2012

Die Basistherapie besteht in einer Änderung des Lebensstils (Comte-Perret et al., 2013): Dabei sollte eine ausgewogene, überwiegend mediterrane und salzarme Ernährung im Vordergrund stehen (Sacks et al., 2001; He et al., 2013). Ebenso sollte eine Gewichtsnormalisierung und regelmäßiges moderates Ausdauertraining angestrebt

werden (DHL, 2008; Cohen, Cohen, 2015; Woodiwiss, Norton, 2015). Bei einem Schlafapnoe-Syndrom sollte eine sogenannte CPAP-Maske (Continuous Positive Airway Pressure) konsequent eingesetzt werden, um die oben angesprochene Hypoxämie zu reduzieren (Marcus et al., 2014; Baquet, 2015). Ein bestehender Diabetes mellitus sollte optimal eingestellt werden, um das Risiko von Gefäßwandveränderungen zu minimieren (Mogensen, 2003). Weiterhin sollten Vorsorgeuntersuchungen gewissenhaft wahrgenommen werden, um Komplikationen frühzeitig zu erkennen (Göbel, Matlach, 2013).

Medikamentös stehen Diuretika, Betablocker, Angiotensin-Converting-Enzyme-(ACE)-Hemmer, Angiotensin-II-Antagonisten (= AT-1-Rezeptorblocker) und Calciumantagonisten mit einem gesicherten prognostischen Nutzen zur Verfügung. Diese sollten nach dem jeweiligen Risikoprofil und den entsprechenden Begleiterkrankungen des Patienten individuell ausgewählt werden (Zidek et al., 2004). Bei inadäquater Monotherapie sollte erst nach einer Dosiserhöhung oder einem Wechsel der Medikamentengruppe eine Kombination mehrerer Medikamente nach dem unten aufgeführten Stufenmodell eingesetzt werden.

#### Empfohlene Zweifachkombinationen:



#### Empfohlene Dreifachkombination:

Diuretikum + Calciumantagonist + ACE-Hemmer / AT-1-Rezeptorblocker

Abb. 1.1.: Empfohlene Zwei- und Dreifachkombination in der Therapie der arteriellen Hypertonie, (Innere Medizin, Herold 2012)

Alpha-1-Blocker, Alpha-2-Blocker und Reninhemmer werden erst bei Nicht-Ansprechen der oben genannten Stufentherapie eingesetzt, da sie keinen gesicherten prognostischen Nutzen aufweisen. Ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt ist eine renale Denervation, die bei therapierefraktärer Hypertonie erwogen werden kann (Donazzan et al., 2015; Hering et al., 2015). Trotz vielversprechender Resultate kann sie auf Grund fehlender studienbasierter Langzeitergebnisse derzeit nicht sicher empfohlen werden (ECS, 2014; Groha et al., 2014; Lambert et al., 2015).

## **1.2. Einflüsse auf die arterielle Hypertonie**

Wie in Kapitel 1.1.3. bereits angesprochen, nehmen sowohl Veränderungen des Lebensstils als auch Medikamente Einfluss auf eine arterielle Hypertonie. In dieser Studie werden die körperliche Aktivität und die medikamentöse Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) mittels des ACE-Hemmers Captopril als Einflussgrößen ausgewählt, da beide Ansätze in der klinischen Standardtherapie enthalten sind und einfach durchzuführen sind. Weiterhin werden die Auswirkungen einer Kombination der beiden Therapieansätze untersucht.

### **1.2.1. Körperliche Aktivität**

Körperliche Aktivität ist ein essentieller Bestandteil in der Therapie der arteriellen Hypertonie. Die körperliche Leistungsfähigkeit gilt „als Prädiktor für die kardiovaskuläre Letalität“ (Stamler, 1991).

Die Deutsche Hochdruckliga empfiehlt in ihren Leitlinien (Stand 2008) eine „regelmäßige körperliche Belastung mittels Wandern, Laufen oder Schwimmen, welche 3-4 x pro Woche über 30 – 45 Minuten durchgeführt“ werden sollte. Durch ein moderates Ausdauertraining kann neben dem Blutdruck auch die Herzfrequenz gesenkt werden und die Sauerstoffausschöpfung des Gewebes wird verbessert. Indem Cholesterin und Triacylglyceride herunter-, und das „high density lipoprotein“ (HDL) heraufreguliert werden, verbessert sich das Verhältnis der Blutfette zueinander (Reid et al., 1994). Über eine Verbesserung der peripheren Insulinresistenz zeigt sportliche Betätigung zusätzlich eine positive Auswirkung bei einem vorhandenen Diabetes mellitus (Fang et al., 2015). Weiterhin regt körperliche Aktivität die Einwanderung von endothelialen Vorläuferzellen und eine Gefäßneubildung an (Fernandes et al., 2012; Ma, Zhao, 2014). Durch die Verminderung von pro-inflammatorischen Zytokinen kann einem kardialen Remodelling

entgegengewirkt werden (Agarwal et al., 2011). Ebenso zeigt sich, dass Dysregulationen im Calciumhaushalt normalisiert und damit die linksventrikuläre Pumpfunktion verbessert werden können (Sugizaki et al., 2011; Locatelli, 2014). Bereits wenige Wochen nach Abbruch der körperlichen Aktivität nähern sich sowohl die Funktionsdaten (systolischer und diastolischer Blutdruck, Herzfrequenz) als auch die Expressionsparameter (Hypertrophie, Calciumhaushalt) ihren Ausgangswerten wieder an (Bocalini et al., 2010; Carneiro-Júnior et al., 2013). Damit zeigt sich, dass eine lebenslange moderate körperliche Aktivität bei der Behandlung der arteriellen Hypertonie von großer Bedeutung ist und einen Basisansatz der nicht-medikamentösen Therapie darstellt (Pagan et al., 2015).

Die Datenlage zu den Auswirkungen von isometrischem Training (Krafttraining) auf bestehenden Bluthochdruck ist derzeit nicht einheitlich, deutet jedoch auf eine pathologische Adaptation des linken Ventrikels an die erhöhten Blutdruckwerte hin (Holloway et al., 2015). In Studien zeigt sich, dass Tiere mit einem etabliertem Hypertonus unter vermehrter sportlicher Betätigung eine schlechte Prognose haben (Schultz et al., 2007; da Costa-Rebello, 2010). Diese Ergebnisse unterstützend empfiehlt die deutsche Hochdruckliga, dass bei der Therapie der arteriellen Hypertonie gezielt auf ein moderates Ausdauertraining und nicht auf Krafttraining geachtet werden soll (Stand 2008).

### **1.2.2. Medikamentöse Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems**

Die Hemmung des Angiotensin Converting Enzymes (ACE) verringert die Bildung von Angiotensin II aus Angiotensin I und zieht eine verminderte Ausschüttung von Aldosteron nach sich. Daraus resultiert ein Blutdruckabfall, welcher zum einen durch eine Vasorelaxation als auch durch eine verminderte Rückresorption von Natrium und Wasser in der Niere zu erklären ist.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und vor allem Angiotensin II induzieren kardiale Umbauprozesse und sind damit langfristig an der Entwicklung einer Herzinsuffizienz beteiligt (Kawaguchi, Kitabatake, 1995). Medikamentöse Blockaden des RAAS an unterschiedlichen Stellen dämpfen das kardiale Remodelling und verbessern damit die Langzeitüberlebensraten (Wollert, Drexler, 1999). Fibrotische, hypertrophe und apoptotische Umbauprozesse können durch medikamentöse Blockaden des RAAS verzögert werden (Yu et al., 2002; Lijnen, Petrov, 2003; Susic et al., 2007). Zudem kann die linksventrikuläre Pumpfunktion durch eine Normalisierung der Gene des Calciumhaushaltes (s.u.) zueinander verbessert werden (Xu et al., 2005).

Captopril wird aus (S)-Prolin und (S)-3-Mercapto-2-methylpropionsäure gebildet und wurde 1977 als erster oral wirksamer ACE-Inhibitor eingesetzt.

Im klinischen Alltag wird überwiegend Enalapril anstelle von Captopril eingesetzt, da Enalapril eine längere Halbwertszeit besitzt (Rumboldt et al., 1988). Durch eine Einmalgabe von Enalapril (im Gegensatz zu einer Mehrfachgabe von Captopril) kann eine bessere Compliance des Patienten erreicht werden. Zusätzlich hat Enalapril einen stärkeren Effekt auf die Blutdrucksenkung als Captopril (Bental et al., 1997). Für die hier dargestellten Experimente an Tieren mit einem Hypertonus spielt dieser Unterschied keine Rolle, da Captopril dem Trinkwasser beigesetzt und somit kontinuierlich aufgenommen wurde, wodurch ein gleichbleibender Blutspiegel des Medikamentes erreicht wird.

### **1.3. Herangezogene kardiale Marker zur Untersuchung eines selbstregenerativen Potentials**

#### **1.3.1. Stammzell- und Differenzierungsmarker**

Eine Druckbelastung des Herzens führt zu adaptiven und maladaptiven Umbauprozessen. Ob an diesem Prozess auch die Rekrutierung und Mobilisierung von zirkulierenden Zellen (Leukozyten, Stammzellen) beteiligt ist, ist derzeit unklar. Die ausgewählten Marker für Stammzellen und deren Differenzierung können in verschiedene Gruppen zusammengefasst werden: Marker für eine Zellmobilisation (SDF-1 $\alpha$ , CXCR-4), Marker für eine kardiale Differenzierung (GATA-4, Mef-2c, Nkx.2a), Marker für eine endotheliale Differenzierung (VE-Cadherin, vWF) und neutrophile Marker (MMP-12).

Der stromal cell derived Factor (SDF-1 $\alpha$ ) und sein dazugehöriger Rezeptor CXCR-4 spielen eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung von Vorläuferzellen. Über diese Achse wandern Zellen mit Differenzierungspotential in ischämische Gebiete ein und sind an Reparaturprozessen nach einem akuten Myokardinfarkt beteiligt (Schlüter et al., 2009; Dong et al., 2012). Weiterhin kann SDF-1 $\alpha$  über die Aktivierung von Progenitorzellen Gefäßneubildungen anregen (Yamaguchi et al., 2003). Auch nach Operationen am Herzen spielt die SDF-1 $\alpha$ –CXCR-4–Achse bei der Rekrutierung von Zellen mit Regenerationspotential eine wichtige Rolle (Mieno et al., 2006; Cavalera, Frangogiannis, 2014). Zusätzlich wird derzeit der Einsatz von SDF-1 $\alpha$  als Biomarker bei einem akuten Koronarsyndrom diskutiert (Wruster et al., 2013). SDF-1 $\alpha$  und sein Rezeptor CXCR-4



sind neben Erkrankungen am Herzen bei verschiedenen extrakardialen Erkrankungen zu finden: sie können bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Werner et al., 2013), aber auch bei verschiedenen Krebserkrankungen nachgewiesen werden und sind dort für die Progression, Angiogenese und die Metastasierung verantwortlich (Teicher, Fricker, 2010).

GATA-4, Mef-2c und Nkx.2a nehmen Einfluss auf die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Kardiomyozyten. Auch für diese Faktoren kann nachgewiesen werden, dass sie an Reparaturmechanismen im ischämischen Herzen beteiligt sind (Orlic et al., 2002). GATA-4 wird durch die SDF-1 $\alpha$ –CXCR-4–Achse aktiviert (Wang, Luther, 2012). Als ein Zinkfinger abhängiger Transkriptionsfaktor reguliert GATA-4 die Differenzierung, das Wachstum und das Überleben von Vorläuferzellen, sowie eine Gefäßneubildung im ischämischen Herzen (Li et al., 2010; Xu et al., 2012). Weiterhin ist GATA-4 an der Entwicklung einer Hypertrophie am Herzen beteiligt und wird daher als möglicher Biomarker für eine essentielle Hypertonie diskutiert (Liang, et al., 2001; Oak et al., 2006; Kontaraki et al., 2011). Eine Inaktivierung von Mef-2c führt zu einem Stillstand kardialer Differenzierungsmöglichkeiten (Morin, 2010). Nkx.2a reguliert die Expression von Transkriptionsfaktoren, die für die kardiale Differenzierung essentiell sind (Tanaka et al., 1999; Akazawa, Komuro, 2005). Mutationen im Nkx.2a-Gen gehen mit angeborenen Fehlbildungen am Herzen einher, wie es bei Herzklappendefekten oder der Fallot-Tetralogie gefunden werden konnte (Ikeda et al., 2002). Weiterhin kann Nkx.2a die Differenzierung von Myofibroblasten unterdrücken (Hu et al., 2010).

Als Marker für die endotheliale Differenzierung werden in dieser Studie VE-Cadherin und der von-Willebrand-Faktor (vWF) herangezogen. Ihre Aufgabe besteht in der vaskulären Regeneration beim Infarktgeschehen (Wojakowski, 2011). Auch diese Faktoren werden über die SDF-1 $\alpha$ –CXCR-4–Achse aktiviert (Shen et al., 2011). Die Matrixmetalloprotease 12 (MMP-12) wird in den Makrophagen gebildet und nimmt als Elastase Einfluss auf die extrazelluläre Matrix. Indem sie Elastin abbaut, verschiebt sie das Gleichgewicht von Collagen und Elastin zugunsten des Collagens. Damit bewirkt sie eine vermehrte Fibrosierung des Gewebes (Levick et al., 2011). Am Herzen resultiert daraus eine erhöhte Steifigkeit des Ventrikels, die langfristig eine diastolische Insuffizienz nach sich ziehen kann. MMP-12 hat zudem eine Bedeutung bei Entzündungsreaktionen, v.a. bei der Entstehung der Arteriosklerose (Matsumoto et al., 1998; Watanabe, Ikeda, 2004). Über eine Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen und Regulierung der Apoptose nehmen Matrixmetalloproteasen weiterhin Einfluss auf das vaskuläre Remodelling (Chen et al., 2013). Matrixmetalloproteasen sind an der Entstehung von Krankheiten am Herzen, wie einer

dilatativen Kardiomyopathie, Restenosierungen und Myokardinfarkten beteiligt (Creemers et al., 2001).

### **1.3.2. Marker für hypertrophe Umbauprozesse**

Eine konzentrische Hypertrophie ist die Folge erhöhter Druckverhältnisse im linken Ventrikel. Langfristig kann daraus eine diastolische Insuffizienz resultieren, die zu einer erhöhten Letalität führt. Weiterhin kann die Hypertrophie des linken Ventrikels als Vorhersagewert kardiovaskulärer Komplikationen angesehen werden (Gosse, 2005). Ein selbst regeneratives Potential macht sich durch die Veränderung eines pathologischen Remodellings in ein physiologisches Remodelling bemerkbar, wie es sich beispielsweise auch unter moderatem Ausdauertraining zeigt (Garciaarena et al., 2009).

Zur Abklärung einer linksventrikulären Hypertrophie werden in dieser Studie das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das brain natriuretische Peptid (BNP) herangezogen, die sich in vielen Studien bereits als Hypertrophieparameter bewährt haben (Harada et al., 1997; Raizada et al., 2001). Sowohl chronische Volumen- als auch Druckbelastungen führen zu einer erhöhten Produktion von ANP und BNP (de Bold et al., 2001). Darüber hinaus bieten ANP und BNP die Möglichkeit zur Erfassung einer Herzinsuffizienz, wobei BNP eine bessere Aussagekraft besitzt als ANP (Gaggin, Januzzi, 2013; Panagopoulou et al., 2013). Erhöhte ANP-Level können bereits im Stadium einer kompensierten Hypertrophie nachgewiesen werden, wohingegen BNP erst im Spätstadium einer Hypertension vermehrt ansteigt (Sakata et al., 2001). Unter der Behandlung mit AT1-Rezeptorblockern und ACE-Hemmern sinkt die Expression von ANP und BNP im linken Ventrikel (Maggia et al., 1999). Vergleichend mit einer Erhöhung der Marker im linken Ventrikel bei der arteriellen Hypertonie können erhöhte ANP- und BNP-Expressionswerte im rechten Ventrikel bei einer pulmonalen Hypertension beobachtet werden (Nakanishi et al., 2001).

### **1.3.3. Marker für fibrotische Umbauprozesse**

Bei hypertensiven Herzerkrankungen zeigt sich ein pathologisches kardiales Remodelling unter anderem in einer vermehrten Fibrose. Wie oben bereits erwähnt, resultiert daraus eine erhöhte Steifigkeit des Ventrikels, die Füllungsprobleme des Herzens und dadurch im zeitlichen Verlauf eine Insuffizienz nach sich ziehen kann. Ein selbst regeneratives Potential äußert sich dadurch, dass fibrotische Umbauprozesse

aufgehalten werden. In dieser Studie werden folgende Fibrosemarker untersucht: Collagen III und Elastin, Decorin, Biglykan und der transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1).

Die extrazelluläre Matrix besteht aus Fasern (Collagene, Elastin), die dem Gewebe durch ihre Struktur sowohl zugfeste als auch zugelastische Stabilität verleihen. Proteoglykane (Biglykan, Decorin) bilden einen weiteren Bestandteil der extrazellulären Matrix, indem sie Wasser binden und Collagene miteinander vernetzen. TGF- $\beta$ 1 wird von Kardiomyozyten gebildet und ist am kardialen Remodelling beteiligt. Indem die Expression von Proteoglykanen und Collagen I, möglicherweise auch Collagen III, gesteigert wird, wirkt TGF- $\beta$ 1 pro-fibrotisch (Heimer et al., 1995). Bei gleichzeitiger Aktivierung der Ornithindecaboxylase (ODC) vermittelt TGF- $\beta$ 1 eine pro-hypertrophe Wirkung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren (Schlüter et al., 2000). Durch Bindung an Decorin kann TGF- $\beta$ 1 in seiner Aktivität blockiert werden. Biglykan spielt diesem Effekt entgegen, indem es diese Inaktivierung wieder aufhebt (Hilderbrand et al., 1994). Angiotensin II stimuliert die Expression von TGF- $\beta$ 1 und beeinflusst die myokardiale Fibrose (Campbell, Katwa, 1997; Lijnen et al., 2000; Rosenkranz, 2004). Durch ein medikamentöses Eingreifen an dem RAAS können neben einer Verminderung der Fibrose auch hypertrophe Vorgänge aufgehalten werden (Yu et al., 2002; Susic et al., 2007).

#### **1.3.4. Marker des Calciumhaushaltes**

Calciumionen spielen bei der elektromechanischen Kopplung im Herzen eine zentrale Rolle (Bers, 2002). Um eine für die Relaxation notwendige niedrige Calcium-Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l zu erreichen, werden Calciumionen über den Natrium-Calcium-Antiporter (NCX) und die Sarkoplasmic endoplasmic reticulum Calcium-transporting ATPase (SERCA) in den Extrazellulärraum bzw. in das sarkoplasmatische Reticulum zurückgepumpt (He et al., 1997). Phospholamban (PLB) reguliert die Aktivität der SERCA, welches im unphosphorylierten Zustand die Aktivität der SERCA hemmt (Edes, Kranias, 1988; Asahi et al., 2003). Durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase kann PLB phosphoryliert und damit die Inhibition aufgehoben werden (Fuller et al., 2004). In der vorgelegten Arbeit wird die Expression von NCX, SERCA und PLB quantifiziert.

Dysregulationen in der Calciumhomöostase sind mit vielen Herzerkrankungen assoziiert (Erkasap, 2007; Periasamy et al., 2008). Bei einer Herzinsuffizienz kann beobachtet werden, dass die SERCA herunter- und der NCX heraufreguliert werden, was sich in

einer eingeschränkten Relaxation des Myokards bemerkbar macht (Beuckelmann et al., 1992; Cory et al., 1993; Lu et al., 2002; Carnicelli et al., 2008). Ein selbst regeneratives Potential zeigt sich in der Verbesserung der Expression der Gene des Calciumhaushaltes (Verhältnis SERCA / NCX) zueinander. Unter körperlicher Aktivität kann ebenfalls eine Normalisierung des Verhältnis SERCA zu NCX beobachtet werden (Sugizaki et al., 2011). Eine Behandlung mit Captopril in Ischämie-Reperfusionsstudien kann den Transport der Calciumionen über eine Aktivierung der SERCA verbessern (Takeo et al., 2000). Durch medikamentöse Blockierung des NCX können die Collagen-Synthese und damit auch fibrotische Umbauprozesse normalisiert werden (Cingolani et al., 2003).

#### **1.4. Fragestellung dieser Arbeit**

In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Schlüter et al., 2009) konnte gezeigt werden, dass über das SDF-1 $\alpha$  – CXCR4 – System Vorläuferzellen in ischämische Gebiete des Herzens einwandern und das kardialen Remodelling beeinflussen.

In dieser Arbeit wird erstmals untersucht, ob über diese Achse eine Rekrutierung von Zellen mit Differenzierungspotenzial und somit ein selbst regeneratives Potenzial auch bei hypertensiven Herzerkrankungen nachweisen werden kann.

Dazu wird neben der Expression kardialer Marker druckinduzierter Umbauprozesse die Expression ausgewählter Stammzell- und Differenzierungsmarker gemessen. Die Ergebnisse von spontan hypertensiven Ratten werden mit Ergebnissen normotensiver Wistar Ratten verglichen und im zeitlichen Verlauf (prähypertensiver Zustand bis zum etablierten Hypertonus) analysiert.

Ergänzend wird untersucht, welchen Einfluss standardtherapeutische Verfahren (körperliche Aktivität, medikamentöse ACE-Hemmung) auf die Expression dieser Stammzell- und Differenzierungsmarker nehmen und welche Bedeutung ihnen in Bezug auf die Progression der hypertrophen Herzerkrankung beigemessen werden kann.

Des Weiteren wird die Gewebespezifität von SDF-1 $\alpha$  genauer untersucht. Dazu werden isolierte Kardiomyozyten mit isolierten kardialen Nicht-Myozyten hinsichtlich ihrer Expression von SDF-1 $\alpha$  verglichen. Plasma- und Nierengewebeproben werden zur weiteren Abklärung der Gewebespezifität von SDF-1 $\alpha$  herangezogen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1. Gewebeproben aus Versuchstieren

In dieser Arbeit wurden Gewebeproben von spontan hypertensiven Ratten und normotensiven Wistar Hannover Ratten unterschiedlichen Alters (1,5 – 18 Monate) untersucht.

Die Tiere, aus denen die Gewebeproben entnommen wurden, kamen aus der Aufzucht des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen. Maximal 7 Tiere wurden in einem Polycarbonat Kunststoffkäfig (L: 595 x B: 380 x H: 200mm) mit einem 70 mm erhöhten Gitterdeckel aus Edelstahl gehalten. Hierbei wurde ein natürlicher Tag-Nacht-Rhythmus, eine Temperatur von  $23 \pm 2$  °C und eine Luftfeuchtigkeit von  $50 \pm 10$  % eingehalten. Die Ernährung der Tiere bestand aus einer Harlan Teklad Global 18% Protein Rodent Diet und frischem Leitungswasser.

Die Gewebeproben der Behandlungsgruppen (körperliche Aktivität, medikamentöse ACE-Hemmung mittels Captopril) wurden aus früheren Versuchsreihen verwendet. Das Studiendesign und die physiologischen Kenngrößen der Tiere werden in folgender Arbeit aufgeführt: da Costa-Rébelo, 2010.

#### 2.1.2. Versuchsgeräte

Abzug Hera Safe	ThermoScientific, Dreieich
Blotkammer	Invitrogen, Karlsruhe
Brutschrank	ThermoScientific, Dreieich
Chemilumineszenz System	PeQlab, Erlangen
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
ELISA Reader infinite M200	Tecan GmbH, Crailsheim
Glasware (Zylinder, Platten, Pipetten)	Schott, Mainz
iCycler	BioRad, München
Laborwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Minishaker	IKA-Werke, Staufen

---

Microtiterplatte (ELISA)	immunological & biochemical testsystems gmbH, Binzwangen
Nanodrop Spectrometer ND-1000	PeQlab, Erlangen
Schüttler	Biometra, Göttingen
Thermal Cycler	Techne, Wertheim-Bestenheid
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Zentrifuge	Heraeus, Hanau

### 2.1.3. Verbrauchsmaterial

Filterpapiere	Biotec Fischer, Reiskirchen
Gele 10% Bis-Tris-Gel, 1,0 mm x 15 well	Invitrogen, Karlsruhe
Membran	Millipore, Schwalbach
Pinzetten	Aesculap, Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Präparierbesteck	Aesculap, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle (Steril, Einwegskalpelle)	pfm medicae ag, Köln
Tubes 0,2 ml domed cap stripes	PeQlab, Erlangen
Zellkulturschalen Falcon	Corning Life Sciences, New York (USA)

### 2.1.4. Chemikalien

Absolute QPCR SYBR Green Mix	ThermoScientific, Dreieich
Antibody (capture/detection; ELISA)	immunological & biochemical testsystems gmbH, Binzwangen
Angiotensin II	Sigma, Taufkirchen

---

Assay Buffer (ELISA)	immunological & biochemical testsystems gmbH, Binzwangen
Aqua bidest	Braun, Melsungen
Benzoase	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau (BPB)	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Carbogen	Linde, Pullach
Carnitin	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Collagenase	Worthington (UK)
Creatinin	Sigma, Taufkirchen
Cytosin-Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP)	Invitrogen, Karlsruhe
Dithiotretiol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fetal calf serum (FCS)	PAA, Pasching (Österreich)
Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hepes	Roth, Karlsruhe
Isoprenalin	Serva, Heidelberg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogentphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt



---

2x Laemmli Puffer	Sigma, Steinheim
Lysispuffer (Western Blot)	Cellsignaling, Leiden (NL)
M199	Biochrom, Berlin
Methanol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transkriptase (RT)	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Roth, Karlsruhe
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck, Darmstadt
Oligo-desoxy-Thymidin (Oligo-dt)	Roche, Mannheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	bioline, Luckenwalde
Penicillin-Streptomycin	Gibco, New York (USA)
PeqGold TriFast	PEQLAB, Erlangen
Phenylephrin	Sigma, Taufkirchen
Phosphataseinhibitor	Sigma, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
Proteaseinhibitor	Sigma, Taufkirchen
RNA-Exitus plus	AppliChem, Darmstadt
RNAasin	Promega, Madison
5x RT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Standard (SDF-1 $\alpha$ ; ELISA)	immunological & biochemical testsystems gmbH, Binzwangen
Stopp solution (ELISA)	immunological & biochemical testsystems gmbH, Binzwangen
Substrate (ELISA)	immunological & biochemical testsystems gmbH, Binzwangen

---

Taurin	Sigma, Taufkirchen
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Tween20	Sigma, Taufkirchen
Washing buffer (ELISA)	immunological & biochemical testsystems gmbH, Binzwangen

Alle übrigen verwendeten Salze und Chemikalien wurden jeweils in der höchsten Qualität bezogen, nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt. Sofern nicht anders angegeben, wurde Aqua bidest als Lösungsmittel verwendet.

### 2.1.5. Antikörper

#### Primäre Antikörper

GAPDH	Mouse	1: 4000	Calbiochem, Billerica (USA)
MMP-12	Rabbit	1: 2000	abcam, Cambridge (UK)
$\beta$ -Actin	Rabbit	1: 1000	Sigma, Taufkirchen
SDF-1 $\alpha$	Rabbit	1: 1000	eBioscience, Hatfield (UK)
Nkx.2a	Goat	1: 1000	Novus Biologicals, Abingdon (UK)
GATA-4	Rabbit	1: 1000	Novus, Biologicals Abingdon (UK)

#### Sekundäre Antikörper

Anti-Mouse IgG	Goat	1: 2000	Affinity Biologicals, Ancaster (Kanada)
Anti-Rabbit IgG	Sheep	1: 2000	Jackson Immunoresearch, Suffolk (UK)
Anti-Goat IgG	Donkey	1: 2000	Affinity Biologicals, Ancaster (Kanada)

### 2.1.6. Primer

Aufgeführt sind die Primersequenzen (Oben forward, unten backward) und die Annealing Temperaturen für die untersuchten Gene.

Gen	Annealing Temperatur (°C)	Gensequenz (Oben forward, unten backward)
ANP	58	5'-CGT GCC CCG ACC CAC GCC AGC--- ATG GGC TCC-3' 5'-GGC TCC GAG GGC CAG CGA GCA--- GAG CCC TCA-3'
B2M	65	5'-GCC GTC GTG CTT GCC ATT C-3' 5'-CTG AGG TGG GTG GAA CTG AGA C-3'
Biglykan	59	5'-TGA TTG AGA ATG GGA GCC TGA G-3' 5'-CCT TGG TGA TGT TGT TGG AGT G-3'
BNP	58	5'-GGG CTG TGA CGG GCT GAG GTT-3' 5'-AGT TTG TGC TGG AAG ATA AGA-3'
Collagen-1	62	5'-GCG AAC AAG GTG ACA GAG-3' 5'-CCA GGA GAA CCA GCA GAG-3'
CXCR-4	55	5'-GCC ATG GCT GAC TGG TAC TT-3' 5'-CAC CCA CAT AGA CGG CCT TT-3'
Decorin	59	5'-GGC AGT CTG GCT AAT GTT C-3' 5'-CTT CGG AGA TGT TGT TGT TAT G-3'
Elastin	56	5'-TGC TAC TGC TTG GTG GAG AAT G-3' 5'-CGT GGC TGC TGC TGT CTG-3'
GATA-4	66	5'-CTA TGG CCG CCA ACC ACG GG-3' 5'-CGC GGA GTG GGC ACG TAG AC-3'
HPRT	63	5'-CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT-3' 5'-CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC-3'
Mef-2c	60	5'-CAG TTG GGA GAC CGT ACC AC-3' 5'-GTG AGT CCA ATG GGG GAG TG-3'
MMP-12	62,5	5'-TGC AGC TGT CTT TGA TCC AC-3' 5'-GCA TCA ATT TTT GGC CTG AT-3'
NCX	53	5'-CCG TAA TCA GCA TTT CAG AG-3' 5'-GCC AGG TTC GTC TTC TTA AT-3'

---

Nkx.2a	60	5'-CAC ACG CCC TCC TCA GTC AA3' 5'-GAG TAG CCG TCC GGC TTG AA-3'
ODC	58	5'-GAA GAT GAG TCA AAC GAG CA-3' 5'-AGT AGA TGT TTG GCC TCT GG-3'
PLB	57,5	5'-TAT GTC TGC TGC TGA TAT GC-3' 5'-ACT CTT AAA TCG TGA CCC TTC-3'
SDF-1 $\alpha$	64	5'-CCA AGG TCG TCG CCG TGC TG-3' 5'-GGC TCT GGC GAC ATG GCT CT-3'
SERCA	57	5'-CGA GTT GAA CCT TCC CAC AA-3' 5'-AGG AGA TGA GGT AGC CGA TGA A-3'
TGF- $\beta$ 1	61	5'-AAT ACG TCA GAC ATT CGG GAA-3' 5'-GTG GAG TAC ATT ATC TTT GCT-3'
VE-Cadherin	55	5'-CCA GAA TTT GCC CAG CCC TA-3' 5'-GTC CTC GTT CTT CAG GGC AA-3'
vWF	55	5'-AAG ATG GCA AGA GAG TGG GC-3' 5'-CCG TAG GCC TCA CTG GAA AG-3'

**2.1.7. Elektronische Datenverarbeitungsprogramme**

ChemiCapt 5000	Vilder, Lorumat (Frankreich)
ELISA Reader	Tecan GmbH, Crailsheim
i-control	Tecan GmbH, Crailsheim
iCycler iQ Optical System Software	BioRad, München
Micosoft Excel	Microsoft, Unterschleißheim
Mircosoft Office	Microsoft,, Unterschleißheim
Microsoft Windows	Microsoft, Unterschleißheim
Nano Drop	Colemann, München
QuantifyOne	BioRad, München

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Studiendesign

In der vorgelegten Arbeit wurden Gewebeproben des linken Ventrikels von 81 spontan hypertensiven (SHR) und 55 Wistar (W) Ratten untersucht, die folgendermaßen gruppiert wurden:

Gruppe der SHR Tiere:

Männliche Tiere: 4 Monate, 9 Monate, 11 Monate, 16 Monate, 18 Monate (je n=6).

Weibliche Tiere: 1,5 Monate, 4 Monate, 7,5 Monate, 16 Monate, 18 Monate (je n=6).

Zusätzliche Gruppen:

SHR, weiblich, 7,5 Monate Laufrad/Running (R) (n=6).

Diese Tiere wurden im Alter von 1,5 Monaten körperlicher Aktivität mittels Laufrad für 6 Monate ausgesetzt. (da Costa-Rebelo, 2010).

SHR, weiblich, 18 Monate Captopril (C), Captopril + Laufrad/Running (CR) (je n=6).

Diese Tiere wurden im Alter von 12 Monaten dem jeweiligen Therapieansatz für 6 Monate ausgesetzt (da Costa-Rebelo, 2010).

Gruppen der Wistar Tiere:

Männliche Tiere: 4 Monate, 9 Monate, 11 Monate, 16 Monate, 18 Monate (je n=6).

Weibliche Tiere: 1,5 Monate, 7, 5 Monate, 18 Monate (je n=6).

Zusätzliche Gruppen:

W, weiblich, 18 Monate Captopril (n=6).

Diese Tiere wurden im Alter von 12 Monaten für 6 Monate mit Captopril behandelt und dienen den SHR Tieren als Kontrollgruppe (s.o., da Costa-Rebelo, 2010).

Zur weiteren Auswertung der Ergebnisse des linken Ventrikels wurden zusätzliche Proben herangezogen:

Plasmaproben: SHR, weiblich, 11 Monate (n=5), 16 Monate (n=6).

Nierengewebeproben: SHR, weiblich, 18 Monate, Laufrad/Running (R), Kontrolle (je n=6).

Weiterhin wurden Zellisulationsversuche mit Kardiomyozyten und kardialen Nicht-Myozyten durchgeführt, bei denen jeweils isolierte Zellen folgender Gruppen untersucht wurden:

SHR, 14 Monate, 16 Monate und 18 Monate (je n=6 Schalen).

W, 14 Monate (n=6 Schalen).

## 2.2.2. Real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.2.2.1. Durchführung

#### RNA-Isolation aus Ganzherzen

Der linke Ventrikel des zu untersuchenden Herzens wird mit einem Skalpell grob zerkleinert und in ein Precelly-Röhrchen gegeben. Nach Hinzugabe von 1 ml Trifast wird die Gewebeprobe mit dem Homogenisator (Programm 3: 2 x 20 sec., 6000 rpm) weiter zerkleinert, wodurch eine homogene Flüssigkeit ohne sichtbare Zellfragmente entsteht. Zu der Probe werden 200 µl Chloroform hinzugegeben und mit dem Vortexer gemischt (gevortext), bis eine milchige Trübung zu erkennen ist. Durch die Zentrifugation (15 Min., 4 °C, 12 500 rpm) bilden sich drei Phasen, von denen der klare Überstand (RNA-Phase) in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und Isopropanol im Verhältnis 1:1 hinzugegeben wird. Die Probe wird gevortext und zur Ausfällung der RNA für eine Stunde bei -20 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 Min., 4 °C, 12 500 rpm) wird der Überstand abgeschüttet und das übrig gebliebene Zellpellet mit 1 ml 70%-igem Ethanol versetzt, gevortext und nochmals zentrifugiert (15 Min., 4 °C, 12 500 rpm). Der Überstand wird erneut abgeschüttet und das zurückgebliebene Pellet 60 Minuten unter einem Abzug getrocknet. Abschließend wird das Pellet mit 50 µl Aqua bidest versetzt, gevortext und auf Eis für 60 Minuten im Kühlschrank zur Lösung des Pellets gelagert. Die Probe wird bei -80 °C aufbewahrt, falls sie nicht direkt für die cDNA-Synthese weiter verwendet wird.

#### Synthese der komplementären DNA (cDNA-Synthese)

Der RNA-Gehalt der Probe wird mittels Nano-Drop gemessen. Dazu wird eingangs ein Standardwert und Nullabgleich durch die Messung mit 1,5 µl Aqua bidest ermittelt. Es werden 1,5 µl der Probe auf den Sensor gegeben und mittels des Programms ND-1000 die Konzentration gemessen. Falls die gemessene Konzentration den Referenzbereich von 200 – 1000 ng/ml überschreitet, wird die Probe mit Aqua bidest in Schritten von 50 µl verdünnt, sodass anschließend in jeder Probe die gleiche Menge an RNA (1 µg) vorhanden ist. Die Probe wird gevortext, in den Thermocycler gestellt und das Programm 1 (15 Min., 60 °C) gestartet. In diesem Schritt wird die RNA denaturiert, damit sich die Reverse Transkriptase im nächsten Schritt gut anlagern kann. Nach Zugabe des Mixes für die cDNA-Synthese wird die Probe zentrifugiert (10 sec., 3000 rpm), in den Thermocycler gestellt und Programm 9 (60 Min., 37 °C; 5 Min., 95 °C) gestartet. Im ersten Schritt des Programmes wird die RNA zu cDNA umgeschrieben, indem die Reverse Transkriptase den RNA-Strang mit Nukleotiden komplementär ergänzt. Im

zweiten Schritt wird die Reverse Transkriptase durch die Temperaturerhöhung inaktiviert. Abschließend wird cDNA Aqua bidest Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Probe wird bei -20 °C aufbewahrt, falls sie nicht direkt für die PCR verwendet wird.

### Real-time PCR

In die PCR-Tubes werden 3 µl der cDNA (verdünnt mit Aqua bidest im Verhältnis 1:10) zweifach vorpipettiert, um Doppelbestimmungen durchzuführen. Aqua bidest wird als Negativkontrolle verwendet. Die forward- und reverse-Primer werden getrennt nach Herstellerangaben in Aqua bidest gelöst und im Verhältnis 1:1 gemischt. Anschließend wird das Primergemisch mit Aqua bidest im Verhältnis 1:10 verdünnt. Nachfolgend werden jeweils 17 µl des PCR-Mixes in die einzelnen Tubes pipettiert. Der PCR-Mix enthält einen Fluoreszenzfarbstoff, der durch Bindung an die DNA aktiviert wird. Durch Messung der Emission kann die Anzahl der PCR-Produkte ermittelt werden. Da die DNA zwei Stränge besitzt, die in jeden Zyklus komplementär ergänzt werden, kommt es zum exponentiellen Anstieg der PCR-Produkte. Die Tubes-Streifen werden mit Deckeln vorsichtig verschlossen und für 10 Sekunden bei 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend werden die Tubes in den iCycler gestellt und das Programm für den jeweiligen Primer gestartet.

1. Zyklus (1x)	95 °C	15 Minuten	Aktivierung Polymerase
2. Zyklus (45x)	95 °C	30 Sekunden	Denaturierung
	x °C	30 Sekunden	Annealing
	72 °C	30 Sekunden	Elongation
3. Zyklus (100x)	50 °C	10 Sekunden	Schmelzkurve

Tab. 2.1: PCR-Programm iCycler (x °C = spezifische Annealing-Temperatur des jeweiligen Primers, s. 2.1.5.)

Der erste Zyklus dient der Aktivierung der Hot-Start-Taq-Polymerase. Im zweiten Zyklus wird die DNA denaturiert, so dass die beiden Stränge vollständig voneinander getrennt vorliegen. Die Primer können sich nun an die Einzelstränge anlagern, wobei für die zu untersuchenden Genabschnitte eine spezifische Temperatur einzustellen ist (siehe Primer in 2.1.6.). Die Polymerase ergänzt die Stränge durch die Anlagerung von Nukleotiden. Da dieser Schritt mehrfach abläuft und jeweils die neuen Doppelstränge wieder komplementiert werden, kommt es zur exponentiellen Anhäufung der PCR-



Produkte. Als Bezugsgröße wird ein house keeping-Gen genutzt, welches unabhängig von dem Versuchsaufbau konstant exprimiert wird.

#### 2.2.2.2. Auswertung

Die Daten werden mittels BioRad und Excel ausgewertet.

#### 2.2.2.3. Zusammensetzung der eingesetzten Reagenzien

##### Mix für die cDNA-Synthese (einfacher Ansatz)

5xRT-Puffer	2 µl
dNTPs	1 µl
DTT	0,5 µl
M-MLV-RT	0,3 µl
Oligo dts	1 µl
RNAsin	0,2 µl

##### PCR MIX

Cyber Green mix	10 µl
Aqua bidest	6,4 µl
Primer	0,6 µl

#### 2.2.3. Western blot

##### 2.2.3.1. Durchführung

##### Proteinisolierung aus Ganzherzen

Zur Isolierung von Proteinen wird 0,1 g des linken Ventrikels abgewogen und in ein Precelly-Röhrchen gegeben. Es werden 500 µl Lysispuffer hinzugegeben und mittels Homogenisator (Programm 3: 2 x 20 sec., 6000 rpm) zerkleinert. Nach einer Inkubation für 10 Minuten auf Eis wird die Probe mittels Ultraschall weiter fragmentiert. Nach einer Zentrifugation (10 Min., 4 °C, 14000 xg) wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Von der Probe werden 10 µl in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit Aqua bidest im Verhältnis 1:50 verdünnt. Davon werden 100 µl mit 40 µl 2x Laemmli-

Puffer versetzt und 5 Minuten im Heizblock (95 °C) denaturiert. Die Probe wird bei -20 °C aufbewahrt, falls sie nicht direkt für den Western Blot verwendet wird.

### Gelelektrophorese

Die Gelkammer wird aufgebaut, indem das Innenteil in die Kammer gesteckt und der Klemmkeil lose in die Kammer gestellt wird. Je nach Bedarf werden ein bzw. zwei Fertiggel(e) aus der Verpackung genommen. Dabei werden MOPS-Gele für die Untersuchung großer Proteine und MES-Gele für die Untersuchung kleiner Proteine verwendet. Der Kamm an der Oberseite des Fertigfels wird entfernt und das Gel mit sterilem Wasser und dem Laufpuffer abgespült. Die Fertiggele werden in die Kammer gestellt und der Klemmkeil gespannt. In den Raum zwischen den Gelen werden 180 ml Laufpuffer mit Antioxidant gegeben, in die äußere Kammer werden 600 ml Laufpuffer gegeben. Die einzelnen Taschen werden mit dem Laufpuffer mittels Spritze und Kanüle ausgespült, während die Proben für 5 Minuten bei 95 °C gekocht, zentrifugiert (10 sec., 3000 rpm) und gevortext werden. In die erste Tasche werden 10 µl des Markerproteins gegeben, anschließend werden je 10 µl jeder Probe in die benachbarten Taschen. Für die Ausführung der Gelelektrophorese wird eine Spannung von 200 V für 50 Minuten angelegt.

### Blot-Verfahren

Nach dem Auseinanderbauen der Gelkammer werden die Fertiggele aus den Plastikkammern genommen und zurechtgeschnitten. Zur Herstellung eines „Gelsandwiches“, das den Transferschritt des Gels auf die Membran darstellt, werden die einzelnen Bestandteile folgendermaßen aufeinandergelegt:

Zwei Schwämme – ein Filterpapier – das Gel – eine Nitrocellulosemembran – ein Filterpapier – zwei Schwämme

Je nach Bedarf werden ein oder zwei Gelsandwich(es) in die Blotkammer gelegt. Diese wird mit dem dazugehörigem Deckel verschlossen und in die Gelkammer gesetzt, die zuvor mit destilliertem Wasser ausgespült wurde. Der Klemmkeil wird festgespannt und die Blotkammer mit Transferpuffer gefüllt. Zur Kühlung wird destilliertes Wasser in die äußere Kammer gefüllt und anschließend eine Spannung von 30 V für 60 Minuten angelegt.

### Proteinnachweis mittels Antikörper

Nach dem Auseinanderbauen der Blotkammer wird die Membran für eine Minute in eine Schale mit sterilem Wasser gelegt, um Pufferreste auszuwaschen. Anschließend wird die Membran in 1x Tris Buffered Saline (TBS) + 5% bovines Serumalbumin (BSA) auf einem Schüttler mit niedriger Einstellung für eine Stunde inkubiert. Durch das bovine Serumalbumin werden freie Bindungsstellen blockiert und somit unspezifische Bindungen der Antikörper vermieden. Die Membran wird erneut für eine Minute mit sterilem Wasser gewaschen und mit dem Erstantikörper (gelöst in 1x TBS + 0,1% Tween20 + 5 % BSA) für 12 Stunden, beispielweise über Nacht, im Kühlraum auf einem Schüttler mit niedriger Einstellung inkubiert. Am Folgetag wird die Membran dreimal für 10 Minuten mit in 1x TBS + 0,1% Tween20 auf dem Schüttler gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper 60 Minuten im Dunkeln ebenfalls auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wird erneut dreimal mit 1x TBS + 0,1% Tween20 gewaschen, wobei im letzten Schritt nur 1x TBS verwendet wird.

### Enhanced-Chemilumineszenz-Detektion (ECL)

Die Membran wird lichtgeschützt für zwei Minuten in der ECL-Lösung inkubiert und auf eine Glasplatte in das Detektionsgerät gelegt. Die ECL-Lösung enthält Luminol, das von der Peroxidase, die an den Zweitantikörper gebundenen ist, oxidiert wird. Es kommt zu einer Lichtemission, die über das Programm ChemiCapt detektiert und die Proteine als einzelne Banden sichtbar macht.

#### **2.2.3.2. Auswertung**

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der Programme QuantityOne und Excel.

#### **2.2.3.3. Zusammensetzung der eingesetzten Reagenzien**

##### Laufpuffer

MOPS bzw. MES SDS Running Puffer (50x)	50 ml
Aqua bidest	950 ml

---

Laufpuffer mit Antioxidant

Laufpuffer	200 ml
NuPAGE Antioxidant	500 µl

Transferpuffer

Aqua bidest	375 ml
NuPAGE Transfer Puffer (20x)	25 ml
Methanol	100 ml
NuPAGE Antioxidant	500 µl

10x TBS

Tris/HCL	10 mmol/l
NaCL	150 mmol/l
ph	7,4

#### **2.2.4. Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Bestimmung der Plasmakonzentration von SDF-1 $\alpha$**

##### **2.2.4.1. Durchführung**

Alle Reagenzien und die Microtiterplatte werden auf Raumtemperatur gebracht. Der Standard wird in 1 ml Assay Buffer gelöst und anschließend aliquotiert, um wiederholtes Auftauen und Einfrieren bei weiteren Durchführungen zu vermeiden. Der biotinylierte Antikörper gegen SDF-1 $\alpha$  wird in 60 µl Assay Buffer gelöst und für eine vollständige Lösung 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Standardreihe wird wie folgt vorbereitet:

Standard 1 (30 ng/ml): 30 µl der Standardlösung in 970 µl Assay Buffer

Standard 2 (20 ng/ml): 20 µl der Standardlösung in 980 µl Assay Buffer

Standard 3 (10 ng/ml): 500 µl von Standard 2 in 500 µl Assay Buffer

Standard 4 (5 ng/ml): 500 µl von Standard 3 in 500 µl Assay Buffer

Standard 5 (2,5 ng/ml): 500 µl von Standard 4 in 500 µl Assay Buffer

Standard 6 (1,25 ng/ml): 500 µl von Standard 5 in 500 µl Assay Buffer

Die zu untersuchenden Plasmaproben werden mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt. Um die Antibody working solution herzustellen, werden der Capture Antikörper und der Detection Antikörper zentrifugiert und in 6 ml Assay Buffer gelöst. (Ansatz für eine voll belegte 96 Well-Platte). Auf Platz A1 und B1 der Microtiterplatte werden je 100 µl Assay Buffer als Blank gegeben, in alle restlichen Wells 50 µl Assay Buffer. Die Plätze C1 bis F2 werden mit 50 µl der Standardreihe befüllt, in die restlichen Wells werden je 50 µl der Proben gegeben, jeweils in Doppelbestimmung. Abschließend wird in jedes Well 50 µl der Antibody working solution pipettiert und für 12 Stunden, beispielsweise über Nacht, bei Raumtemperatur inkubiert.

Am Folgetag werden die Reagenzien wieder auf Raumtemperatur gebracht und die conjugate working solution hergestellt, indem das Conjugate und der Assay Buffer im Verhältnis 1:2000 angesetzt werden. Die Microtiterplatte wird zunächst manuell gewaschen, indem die Antibody working solution durch schnelles Umdrehen der Microtiterplatte abgegossen wird. Mit einer Multipipette werden 100 µl Waschpuffer in jedes Well gegeben und 20 Sekunden inkubiert. Insgesamt wird dieser Schritt dreimal durchgeführt. Anschließend werden 100 µl der Conjugate working solution in jedes Well gegeben und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschzyklus wird daraufhin wie oben beschrieben insgesamt dreimal wiederholt. Danach werden 100 µl der Substrate solution in jedes Well gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, wobei sich eine unterschiedliche Blaufärbung der einzelnen Wells zeigt (Peroxidase-Reaktion). Abschließend werden 100 µl der Stopp solution in jedes Well gegeben, was einen Farbumschlag von blau zu gelb zur Folge hat.

#### **2.2.4.2. Auswertung**

Mittels ELISA-Reader wird die Extinktion bei 450 nm gemessen und mit Hilfe von i-control und einer Excel-Tabelle ausgewertet.

## 2.2.5. Stimulation isolierter Kardiomyozyten

### 2.2.5.1. Durchführung

#### Organpräparation und -perfusion

In einen verschlossenen Glastopf wird das Versuchstier durch Zugabe von Isofluran betäubt (Anzeichen für eine Sedierung: flache Atmung, fehlender Lidreflex, etvl. Speichelfluss) und durch eine zervikale Dislokation getötet. Der Thorax wird unterhalb des Sternums eröffnet und das Herz-Lungen-Paket entnommen. Dieses wird in 4°C kalter NaCl-Lösung geschwenkt, um den Stoffwechsel zu verlangsamen und die Gefahr einer Hypoxie für das Herz zu reduzieren. Anschließend werden sowohl die beiden Lungenlappen als auch die Trachea und der Ösophagus von dem Herzen freipräpariert und abgetrennt. Das Fett an dem Aortenbogen wird ebenfalls abpräpariert und die Aorta wird hinter den ersten abzweigenden Arterien abgetrennt. Das freipräparierte Herz wird in eine Schale gelegt und unter die Perfusionsanlage gestellt. Das Durchflussventil wird geöffnet und eine Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen pro Sekunde eingestellt. Die Aortenöffnung wird mit zwei Pinzetten gefasst und über die Kanüle der Perfusionsanlage gestülpt. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Kanüle nicht zu tief in das Herz vorgeschoben wird, da durch eine Verletzung der Herzklappen die Perfusion über die Herzkranzgefäße dann nicht mehr gesichert ist. Die Aorta wird mit einer Pinzette an der Kanüle festgeklemmt und anschließend mit einem Leinenfaden festgebunden. Das obere Reservoir wird mit 80 ml Powell-Medium gefüllt. Anschließend wird das Herz mit 35 ml des Powell-Mediums gespült, um überschüssiges Blut aus dem Herzen auszuwaschen. Danach wird der seitliche Auffangbehälter unter das Herz geschoben, um einen Kreislauf für die Perfusion zu ermöglichen. Das Perfusionsmedium (versetzt mit Collagenase) wird in das obere Reservoir gegeben und somit die Perfusionsphase eingeleitet (männliche Tiere 25 Min., weibliche Tiere 28 Min.).

#### Isolierung von Kardiomyozyten

Nach der Perfusion wird das Durchflussventil geschlossen und die Pumpe abgestellt. Das Herz wird mit der Pinzette so gefasst und abgeschnitten, dass die Aorta und die Vorhöfe an der Kanüle hängenbleiben. Das Herz wird auf ein Uhrglas gelegt und zweimal zur Mitte hin eingeschnitten. Auf einer Teflonscheibe wird das Herz mit einer Schnittstärkeneinstellung von 0,7 mm je einmal längs und einmal quer zerkleinert. Der Zellbrei wird mittels Skalpell wieder auf das Uhrglas gegeben und erneut manuell mit dem Skalpell zerkleinert. Anschließend wird der Zellbrei in einem Reaktionsgefäß mit

12 ml des Perfusionsmediums (versetzt mit Collagenase) versetzt und im Wasserbad inkubiert (5 Min., 37 °C.). Währenddessen wird Zellbrei mit einer Pipette vorsichtig auf- und abgesaugt, um ein besseres Durchmischen des Zellepellets mit dem Perfusionsmedium zu ermöglichen. Anschließend wird das Röhrchen aus dem Wasserbad genommen und der Zellbrei wird unter langsamen Schwenken in einen Trichter gegeben. Nach der Filtration erfolgt eine Zentrifugation des Zellbreis (3 Min., 400 rpm). In

einen Messzylinder werden 6 ml des Perfusionsmediums (versetzt mit Collagenase) und 12,5 µl CaCl<sub>2</sub> gegeben. Der Überstand wird abgesaugt und der Inhalt des Messzylinders wird vorsichtig auf das Zellpellet gegeben. Nach vorsichtigem Schwenken wird das Gemisch zentrifugiert (2 Min., 400 rpm). In einem weiteren Messzylinder werden 12 ml des Powell-Mediums und 120 µl CaCl<sub>2</sub> gegeben und der Überstand wird abgesaugt. Je 6 ml werden in zwei Röhrchen aufgeteilt. Danach werden in einem weiteren Messzylinder 6 ml des Powell-Mediums mit 25 µl CaCl<sub>2</sub> versetzt. Der Überstand wird abgesaugt und der Inhalt des Messzylinders wird vorsichtig auf das Zellpellet gegeben. Nach vorsichtigem Schwenken wird das Gemisch mit einer Pipette auf die zwei 12 ml Röhrchen verteilt. Nach einer erneuten Zentrifugation (1 Min., 300 rpm) wird der Überstand abgesaugt. Das Pellet wird unter der Sterilbank in das Ausplattiermedium gegeben, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und anschließend in die einzelnen Schalen ausplattiert.

#### Stimulation isolierter Kardiomyozyten

Unter einem sterilen Abzug werden zur Vorbereitung der Stimulation 1 ml (kleine Schale für Protein-Extraktion) bzw. 2 ml (große Schalen für RNA-Extraktion) des Vorplattiermediums auf jede Zellkulturschale gegeben und diese für 24 h im Brutschrank (37 °C) inkubiert. Damit wird eine bessere Anhaftung der Zellen an die Zellkulturschalen erreicht.

Am Folgetag wird unter einem sterilen Abzug das Ausplattiermedium im Wasserbad aufgewärmt und anschließend vorsichtig mit dem Zellpellet vermischt. Das Vorplattiermedium wird aus den Schalen abpipettiert. Daraufhin werden 1 ml bzw. 2 ml des Gemisches aus Ausplattiermediums und Zellen auf die Zellkulturschalen verteilt. Diese werden für 60 Minuten im Brutschrank (37 °C) inkubiert. Um die Zellen zu waschen, wird das Ausplattiermedium vorsichtig mit einem Sauger aus den Schalen abgesaugt und es werden 1 ml bzw. 2 ml des Waschmediums in jede Schale gegeben. Nach zweimaligem Spülen mit dem Waschmedium werden verschiedene Stimulanzen

(je 10 µl für kleine Schalen bzw. 20 µl für große Schalen) in die entsprechenden Schalen hinzugegeben und im Brutschrank (37 °C) für 24 h inkubiert.

#### RNA- bzw. Proteinextraktion

Für die Isolierung von RNA wird das Medium aus den Schalen abgegossen. In die erste Schale werden 700 µl PBS Puffer gegeben und mit einem Spatel ausgekratzt. Die Pufferlösung wird mit einem Sauger aufgesaugt und in nächste Schale gegeben. Dieser Prozess wird so lange wiederholt, bis alle Proben in der letzten Schale gesammelt sind. Anschließend wird das Gemisch der Proben mit der Pipette aufgesaugt und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Der oben beschriebene Prozess wird erneut mit 700 µl PBS Puffer wiederholt und in das Reaktionsgefäß dazugegeben. Nach der Zentrifugation der Proben (5 Min., 3500 rpm) wird der Überstand vorsichtig abgegossen und das Pellet bei -80°C aufbewahrt, falls die isolierte RNA nicht direkt für eine PCR weiter verwendet wird.

Für die Gewinnung von Proteinen wird das Medium aus den Zellkulturschalen abgegossen und in jede Schale werden 100 µl Lysispuffer gegeben. Anschließend werden die Proben auf einem Schüttler (15 Min., mittlere Stufe) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzugeben von 5 µl Benzoase werden die Proben erneut auf dem Schüttler (10 Min., mittlere Stufe) inkubiert. Danach werden die Proben mit einem Schaber aus jeder Schale gekratzt und in ein eigenes Reaktionsgefäß gegeben. Die Proben werden bei -20°C aufbewahrt, falls die nicht direkt für einen Western Blot weiter verwendet werden.

#### **2.2.5.2. Auswertung**

Da die Proben entweder für die Erstellung einer PCR oder für einen Western Blot weiter verwendet werden, entspricht die Auswertung dem jeweiligen Verfahren (siehe oben).



### 2.2.5.3. Zusammensetzung der eingesetzten Reagenzien

#### Powell-Medium (Hepes-gepuffertes Perfusionsmedium mit Glucose) (Ansatz für 1 l)

NaCl	110 mM	6,43 g
KCl	2,5 mM	0,19 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM	0,16 g
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM	0,30 g
Hepes-Medium	25 mM	5,96 g
Glucose-Monohydrat	10,0 mM	1,98 g

#### Hepes-Medium

M199 (2 Päckchen) wird in 10 l Aqua bidest für 15 Minuten gelöst. Anschließend werden 36 g Hepes hinzugeben und das Medium wird auf eine pH von 7,4 eingestellt.

#### Perfusionsmedium (versetzt mit Collagenase)

Collagenase	5 mg
Powell	5 ml
CaCl <sub>2</sub>	12,5 µl

#### Creatin-Carnitin-Taurin- (CCT)-Medium

M199 (2 Päckchen) wird in 10 l Aqua bidest gelöst. Anschließend werden 36 g Hepes hinzugeben und für 60 Minuten gemischt. Danach werden 5 mM Creatin, 2 mM Carnitin, 5mM Taurin, 10 µM Cytosin-Arabinofuranosid hinzugeben und ein pH von 7,4 eingestellt.

#### Vorplattiermedium

CCT-Medium	50 ml
4% FCS	2 ml
2% Penicillin-Streptomycin	1 ml

---

Ausplattiermedium = Waschmedium

CCT-Medium	50 ml
2% Penicillin-Streptomycin	2 ml

Lysis-Puffer

DTT 1M	100 µl
Lysispuffer	885 µl
Phosphataseinhibitor	5 µl
Proteaseinhibitor	10 µl

## **2.6. Statistik**

Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) bzw. als box plots (5% - 95% - Konfidenzintervalle) dargestellt. Statistische Differenzen werden durch die ANOVA-Analyse angegeben. Der Student-Newman-Keuls-Test wird als post-hoc Analyse eingesetzt. Werte von  $p < 0,05$  werden als statistisch signifikant angesehen. Diese werden mit dem Symbol + oder # wiedergegeben, teilweise sind direkte p-Werte angegeben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Molekulare Adaptation im linken Ventrikel bei chronischer Druckbelastung: Vergleich männlicher spontan hypertensiver mit normotensiven Ratten

##### 3.1.1. Expressionsänderungen etablierter kardialer Marker bei druckinduzierten Umbauprozessen am linken Ventrikel

Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die Expression der untersuchten Parameter im linken Ventrikel von spontan hypertensiven Ratten [Anzahl (n)=6] im Vergleich zu normotensiven Ratten (n=6) im Alter von vier Monaten. Es wird die Differenz der Expression von spontan hypertensiven Ratten und normotensiven Wistar Ratten dargestellt.

Es werden folgende Parameter funktioneller Gruppen untersucht: Marker für eine Hypertrophie (ANP, BNP), Marker für eine Fibrose (TGF- $\beta$ 1, Biglykan, Decorin, Collagen-1, Elastin, MMP-12) und Marker für den Calciumhaushalt (SERCA, NCX, PLB). Bei allen Markern ist Hochregulierung zu beobachten, allerdings in deutlich unterschiedlichem Maße (rot dargestellt sind signifikante Veränderungen). Hervorzuheben ist eine sehr starke Zunahme der Expression von MMP-12 um das 22-fache, ebenso eine Induktion pro-hypertropher und pro-fibrotischer Gene (ANP, TGF- $\beta$ 1, Biglykan).

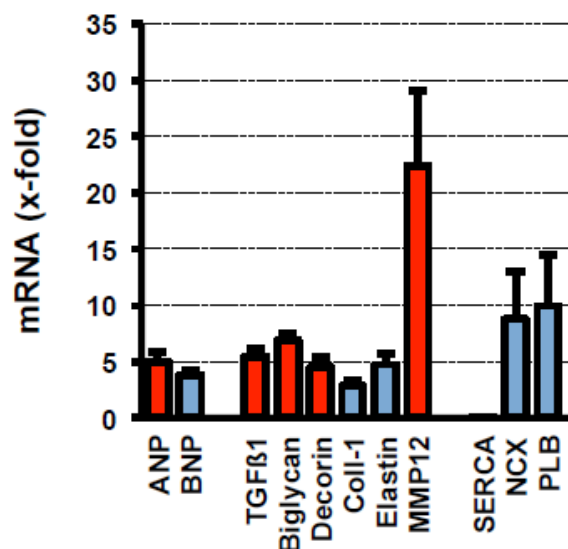


Abb. 3.1: Expression kardialer Marker druckinduzierter Umbauprozesse am linken Ventrikel von vier Monate alten männlichen spontan hypertensiven Ratten. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der Differenz von spontan hypertensiven und normotensiven Ratten von n=6 Tieren, normiert auf die durchschnittliche Expression von geschlechts- und altersgleichen normotensiven Tieren. Rot dargestellt sind Werte für  $p < 0,05$  versus den normotensiven Tieren.

### 3.1.2. Expressionsänderungen von Stammzell- und Differenzierungsmarkern im linken Ventrikel von männlichen spontan hypertensiven Ratten

Abbildung 3.2 zeigt die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern im linken Ventrikel von männlichen spontan hypertensiven Ratten (rot, n=6) im Vergleich mit normotensiven Ratten (weiß, n=6) im Alter von vier Monaten.

Auch hier können mehrere Parameter zu verschiedenen Gruppen zusammengefasst werden: Marker für eine Zellmobilisation (SDF-1 $\alpha$ , CXCR-4), Marker für eine kardiale Differenzierung (GATA-4, Mef-2c, Nkx.2a), Marker für eine endotheliale Differenzierung (VE-Cadherin, vWF) und MMP-12 als neutrophiler Marker.

Die Expression der untersuchten Stammzell- und Differenzierungsmarker ist bei den spontan hypertensiven Ratten gegenüber den normotensiven Ratten im linken Ventrikel zu diesem Zeitpunkt erhöht. Hervorzuheben ist, dass allein die Expression von Nkx.2a nicht erhöht ist.

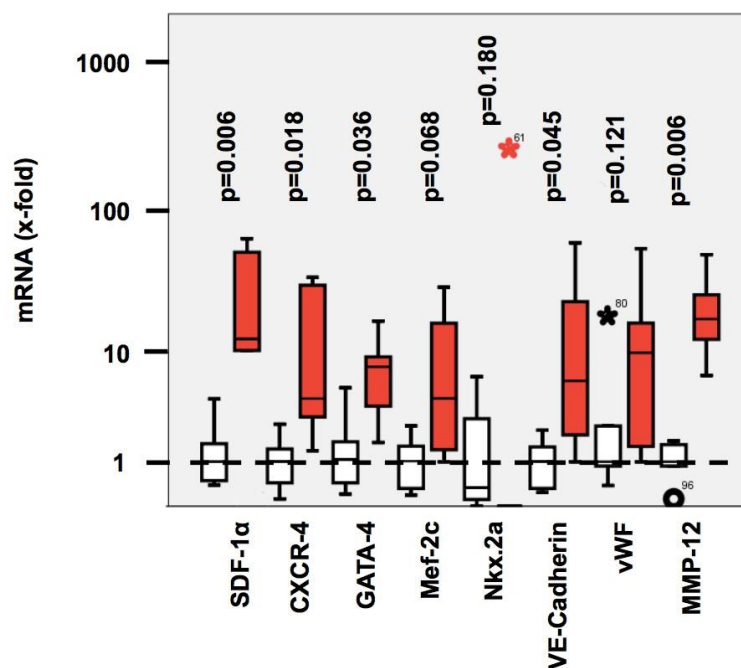


Abb. 3.2: Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern bei vier Monate alten männlichen spontan hypertensiven und normotensiven Ratten. Dargestellt sind box plots (Median und 5% – 95%-Konfidenzintervall) für die untersuchten Marker von n=6 Tieren, normiert auf geschlechts- und altersgleiche normotensive Tiere (gestrichelte Linie). Die Werte der hypertensiven Tiere sind rot, die der normotensiven weiß dargestellt. Werte unterhalb des 5%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Kreis, Werte oberhalb des 95%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Stern abgebildet. Exakte p-Werte sind angegeben. Die Werte einzelner Tiere außerhalb der Konfidenzintervalle sind als einzelne Zahl angegeben.

---

### **3.1.3. Expressionsänderungen von Stammzell- und Differenzierungsmarkern im linken Ventrikel bei männlichen spontan hypertensiven Ratten im zeitlichen Verlauf**

Abbildung 3.3 zeigt die Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker im linken Ventrikel bei männlichen spontan hypertensiven Ratten im zeitlichen Verlauf (4 bis 19 Monate).

Bei SDF-1 $\alpha$ , CXCR-4, vWF und MMP-12 findet man einen kongruenten biphasischen Verlauf mit den Maxima bei neun und 16 Monaten (Ausnahme Nkx.2a). Bei dem Marker MMP-12 ist das zweite Maximum mit einem fast 20-fachen mRNA-Anstieg am deutlichsten ausgeprägt. Auffallend ist eine Abnahme der Expression aller Parameter bis zum 11. Monat.

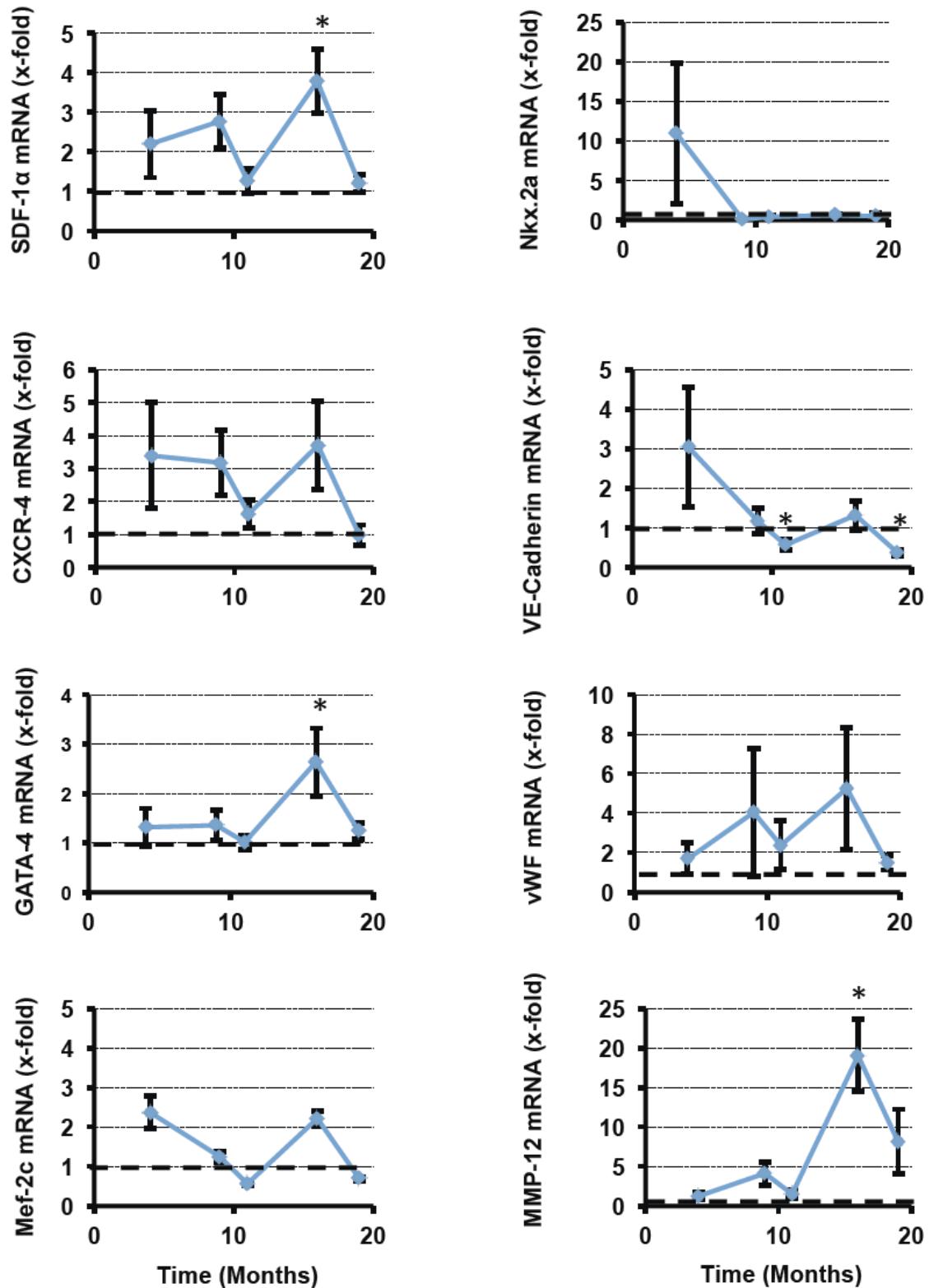


Abb. 3.3: Zeitlicher Verlauf der Stammzell- und Differenzierungsmarker bei männlichen spontan hypertensiven Ratten (4 Monate bis 19 Monate). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von n=6 Tieren, normiert auf die durchschnittliche Expression von geschlechts- und altersgleichen normotensiven Tieren (gestrichelte Linie). \*,  $p < 0,05$  versus den normotensiven Tieren.

Abbildung 3.4 zeigt die Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker bei 11 Monate alten männlichen spontan hypertensiven Ratten (rot, n=6) im Vergleich zu normotensiven Wistar Ratten (weiß, n=6).

Damit soll der Frage nachgegangen werden, ob die Herabregulierung der Stammzell- und Differenzierungsmarker bei den spontan hypertensiven Ratten zwischen dem 9. und dem 11. Monat (s. Abb. 3.3) altersbedingt ist und somit gegenüber normotensiven Ratten weiterhin erhöht bleibt.

Im Mittel werden alle untersuchten Marker bei den spontan hypertensiven Ratten vermehrt exprimiert. Dies kann allerdings nur für GATA-4 und Nkx.2a signifikant nachgewiesen werden.

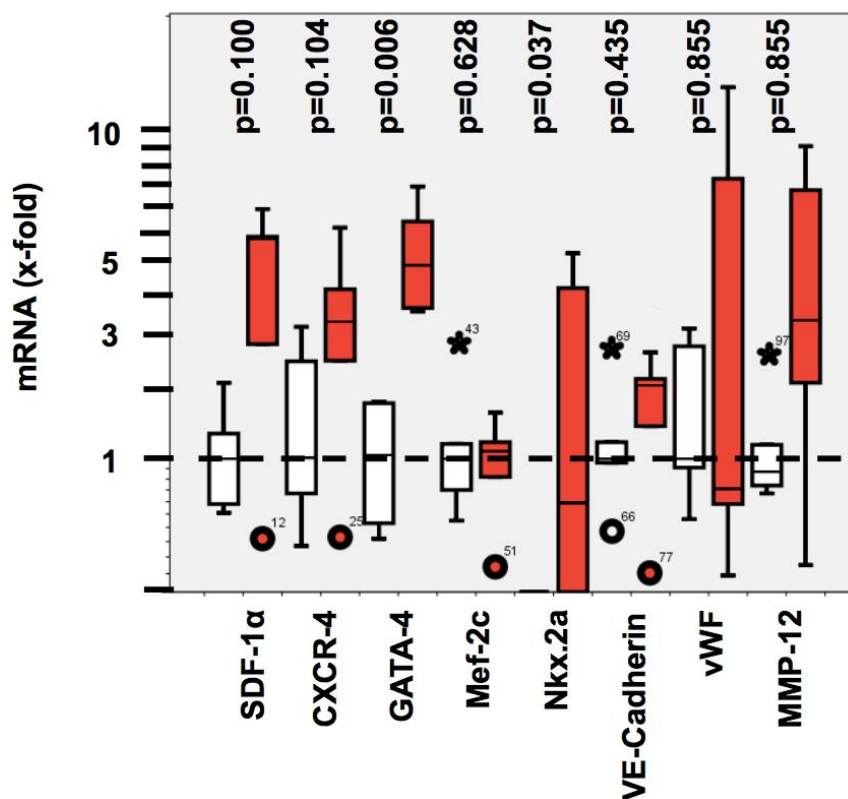


Abb. 3.4: Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker bei 11 Monate alten männlichen spontan hypertensiven und normotensiven Ratten. Dargestellt sind box plots (Median und 5% – 95%-Konfidenzintervall) für die untersuchten Marker von n=6 Tieren, normiert auf geschlechts- und altersgleiche normotensive Tiere (gestrichelte Linie). Die Werte der hypertensiven Tiere sind rot, die der normotensiven weiß dargestellt. Werte unterhalb des 5%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Kreis, Werte oberhalb des 95%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Stern abgebildet. Exakte p-Werte sind angegeben. Die Werte einzelner Tiere außerhalb der Konfidenzintervalle sind als einzelne Zahl angegeben.



### 3.2. Molekulare Adaptation im linken Ventrikel bei chronischer Druckbelastung: Vergleich weiblicher spontan hypertensiver mit normotensiven Ratten

#### 3.2.1. Hypertrophiemodell bei weiblichen prähypertensiven Ratten

Abbildung 3.5. zeigt die Expression von ANP und TGF- $\beta$ 1 im linken Ventrikel von weiblichen prähypertensiven Ratten (S, rot, n=6) im Vergleich mit normotensiven Ratten (W, weiß, n=6) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1,5; 7,5 und 18 Monate).

Um die bereits an männlichen Ratten erhobenen Befunde (s. Abb. 3.1) mit Daten von weiblichen Ratten vergleichen zu können, wird zunächst die Expression bekannter Hypertrophie assoziierter Marker bei weiblichen Ratten untersucht.

Wie in Abbildung 3.5 zu sehen ist, ist weder die Expression von ANP noch die von TGF- $\beta$ 1 im Alter von 1,5 Monaten (prähypertensiver Zustand) erhöht. Beide Parameter werden jedoch im weiteren Verlauf auf dem Boden der Hypertension und damit verbunden Hypertrophie erwartungsgemäß zunehmend exprimiert.

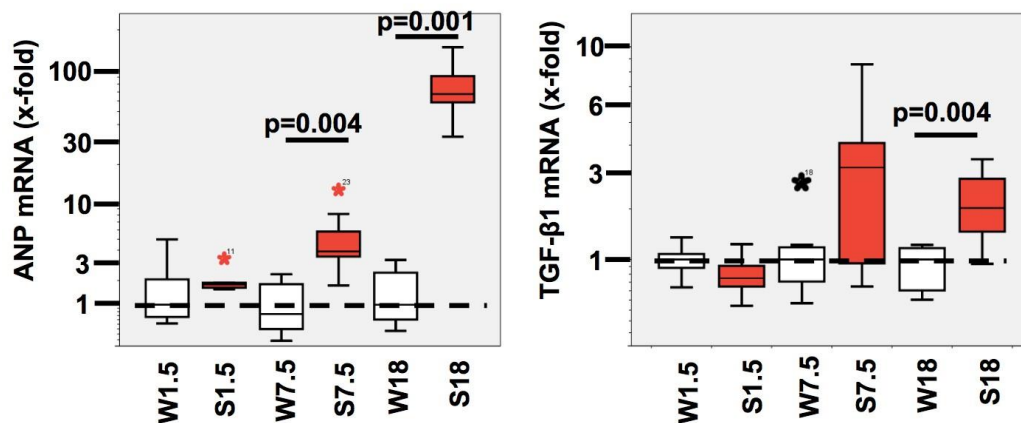


Abb. 3.5: Expression der Hypertrophieparameter bei weiblichen Ratten im Vergleich zu normotensiven Ratten im zeitlichen Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate). Dargestellt sind box plots (Median und 5% – 95%-Konfidenzintervall) für die untersuchten Marker von n=6 Tieren, normiert auf geschlechts- und altersgleiche normotensive Tiere (gestrichelte Linie). Die Werte der hypertensiven Tiere (S) sind rot, die der normotensiven (W) weiß dargestellt. Werte unterhalb des 5%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Kreis, Werte oberhalb des 95%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Stern abgebildet. Exakte p-Werte sind angegeben. Die Werte einzelner Tiere außerhalb der Konfidenzintervalle sind als einzelne Zahl angegeben.

---

### **3.2.2. Expressionsänderungen von Stammzell- und Differenzierungsmarkern im linken Ventrikel bei weiblichen spontan hypertensiven Ratten**

Abbildung 3.6. zeigt die Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker im linken Ventrikel bei weiblichen spontan hypertensiven Ratten (S, rot, n=6) ist im Vergleich zu normotensiven Ratten (W, weiß, n=6) zu verschiedenen Zeitpunkten (1,5; 7,5 und 18 Monate).

Es zeigt sich, dass die Expression dieser Parameter bei den spontan hypertensiven Ratten gegenüber den normotensiven Ratten kaum erhöht ist. Auffällig ist eine vermehrte Expression von GATA-4 bei den prähypertensiven Ratten (rot, 1,5 Monate), sowie die starke Abnahme von VE-Cadherin in älteren spontan hypertensiven Ratten.

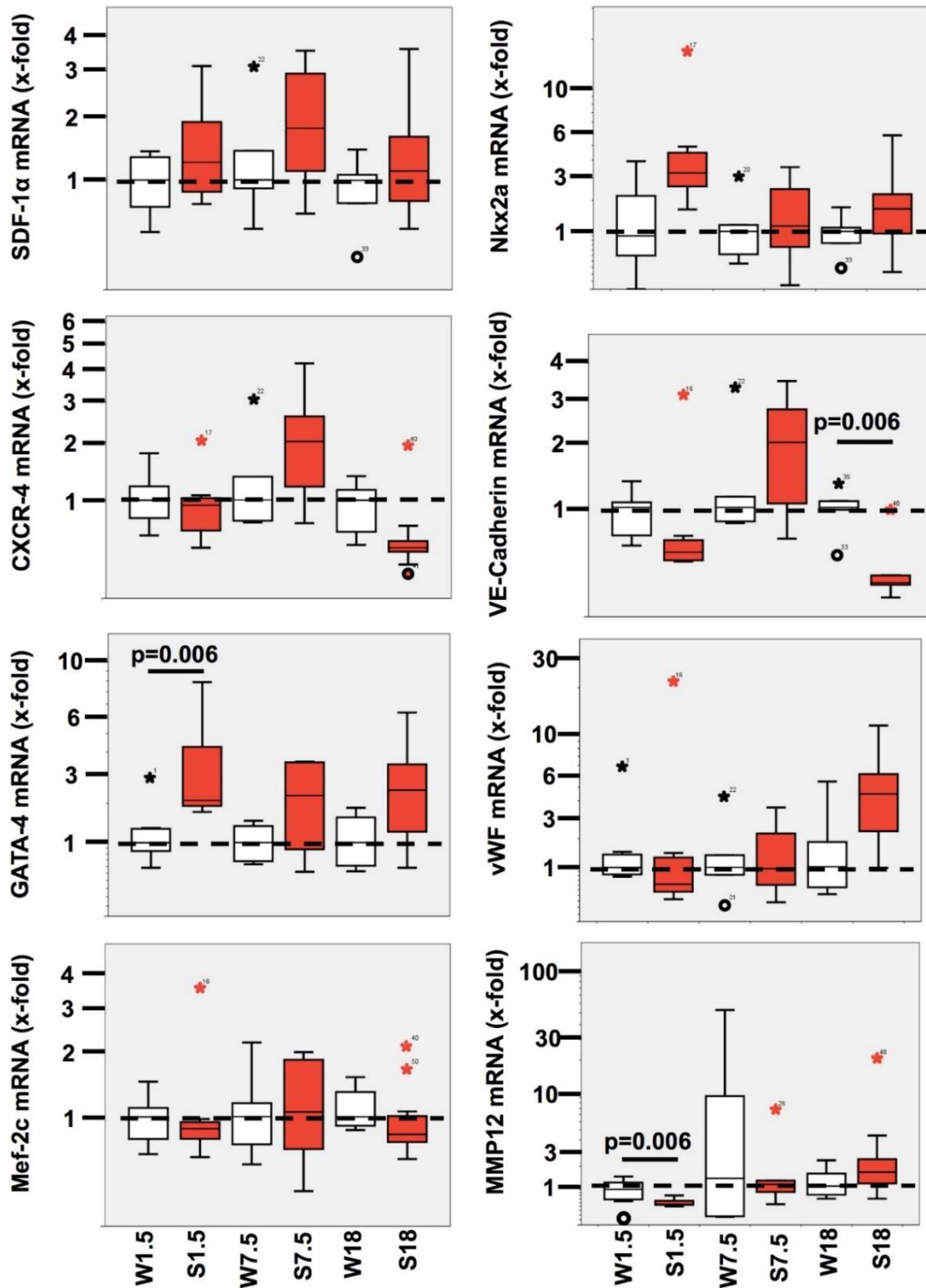


Abb. 3.6: Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker bei weiblichen prähypertensiven Ratten im Vergleich zu normotensiven Ratten im zeitlichen Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate). Dargestellt sind box plots (Median und 5% – 95%-Konfidenzintervall) für die untersuchten Marker von n=6 Tieren, normiert auf geschlechts- und altersgleiche normotensive Tiere (gestrichelte Linie). Die Werte der hypertensiven Tiere (S) sind rot, die der normotensiven (W) weiß dargestellt. Werte unterhalb des 5%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Kreis, Werte oberhalb des 95%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Stern abgebildet. Exakte p-Werte sind angegeben. Die Werte einzelner Tiere außerhalb der Konfidenzintervalle sind als einzelne Zahl angegeben.

---

### **3.2.3. Expressionsänderungen von Stammzell- und Differenzierungsmarkern im linken Ventrikel bei weiblichen spontan hypertensiven Ratten im zeitlichen Verlauf**

Abbildung 3.7 zeigt die Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker im linken Ventrikel bei weiblichen spontan hypertensiven Ratten im zeitlichen Verlauf (1,5 bis 18 Monate).

Der biphasische Verlauf mit einer späten Induktion der Stammzell- und Differenzierungsmarker im Alter von 16 Monaten, der bei den männlichen Ratten beobachtet wurde (siehe Abb. 3.3), kann hier nicht nachgewiesen werden.

Auffällig ist hier eine massive Expressionszunahme von MMP-12 im Alter von 4 Monaten.

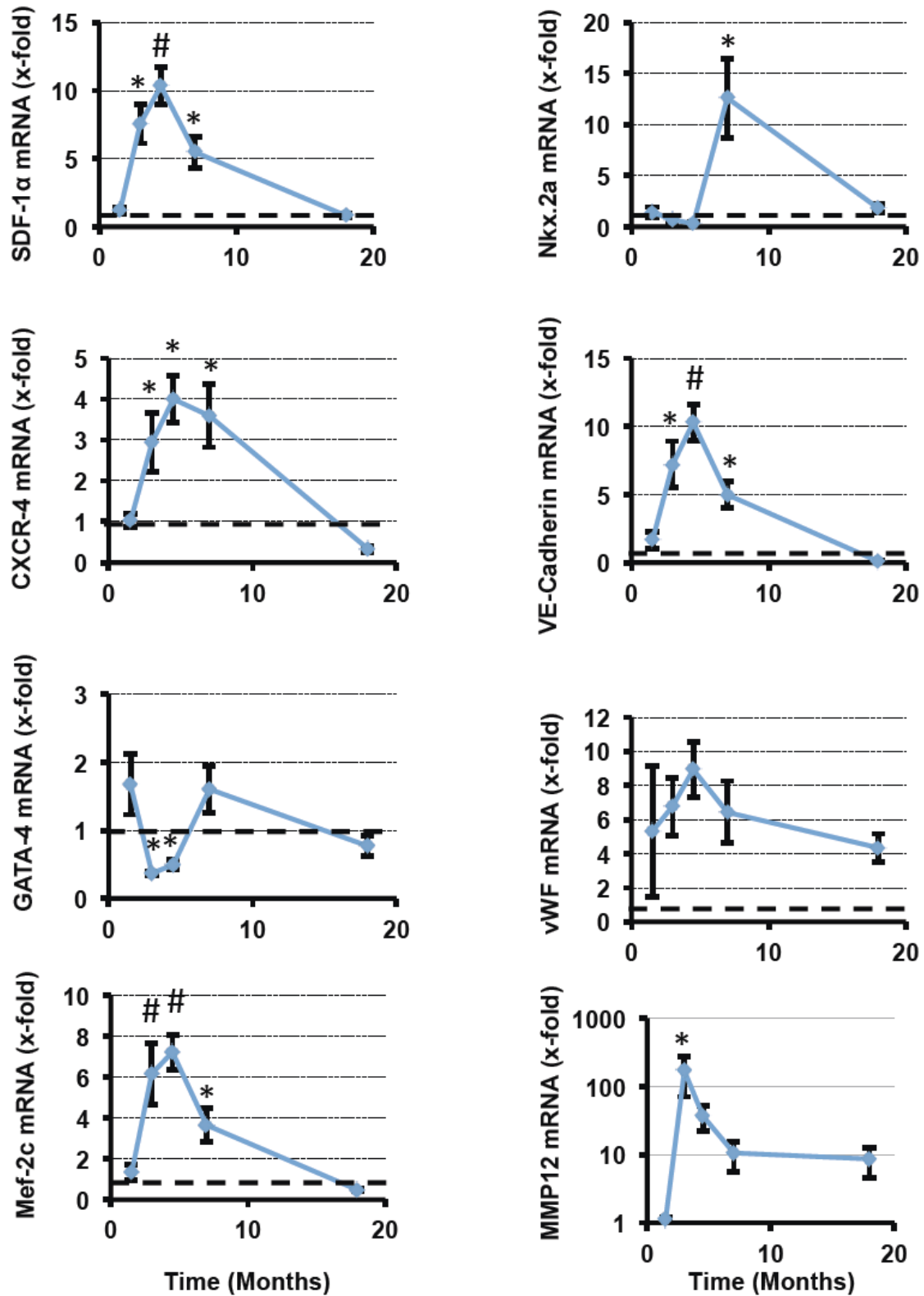


Abb. 3.7: Zeitlicher Verlauf der Stammzell- und Differenzierungsmarker bei weiblichen prähypertensiven Ratten (4 Monate bis 18 Monate). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von n=6 Tieren, normiert auf die durchschnittliche Expression bei geschlechts- und altersgleichen normotensiven Tieren (gestrichelte Linie). \*, p<0,05 versus den normotensiven Tieren. #, p<0,05 versus allen anderen Gruppen.

---

### 3.2.4. Einfluss prohypertropher Stimulation auf die kardiale GATA-4-Expression

Abbildung 3.8 zeigt die Proteinexpression von GATA-4, Nkx.2a und SDF-1 $\alpha$  von isolierten adulten ventrikulären Kardiomyozyten nach einer Inkubation mit prohypertrophen Stimulantien.

Die vermehrte Expression von GATA-4 bei weiblichen prähypertensiven Ratten im Alter von 1,5 Monaten (s. Abb. 3.6) könnte ein initialer Trigger für die sich entwickelnde Hypertrophie sein.

Um diese Hypothese zu testen, werden isolierte adulte ventrikuläre Kardiomyozyten für 24 Stunden mit folgenden prohypertrophen Stimuli inkubiert: Endothelin-1 (blau), Isoprenalin (grün), Phenylephrin (rot) und Angiotensin II (gelb), Kontrolle (weiß). Anschließend wird die Proteinexpression von GATA-4, Nkx.2a und SDF-1 $\alpha$  gemessen. Dabei führt ausschließlich Phenylephrin zu einer Zunahme der GATA-4-Expression. Die Expression von Nkx.2a und SDF-1 $\alpha$  wird durch keinen der Stimuli beeinflusst.

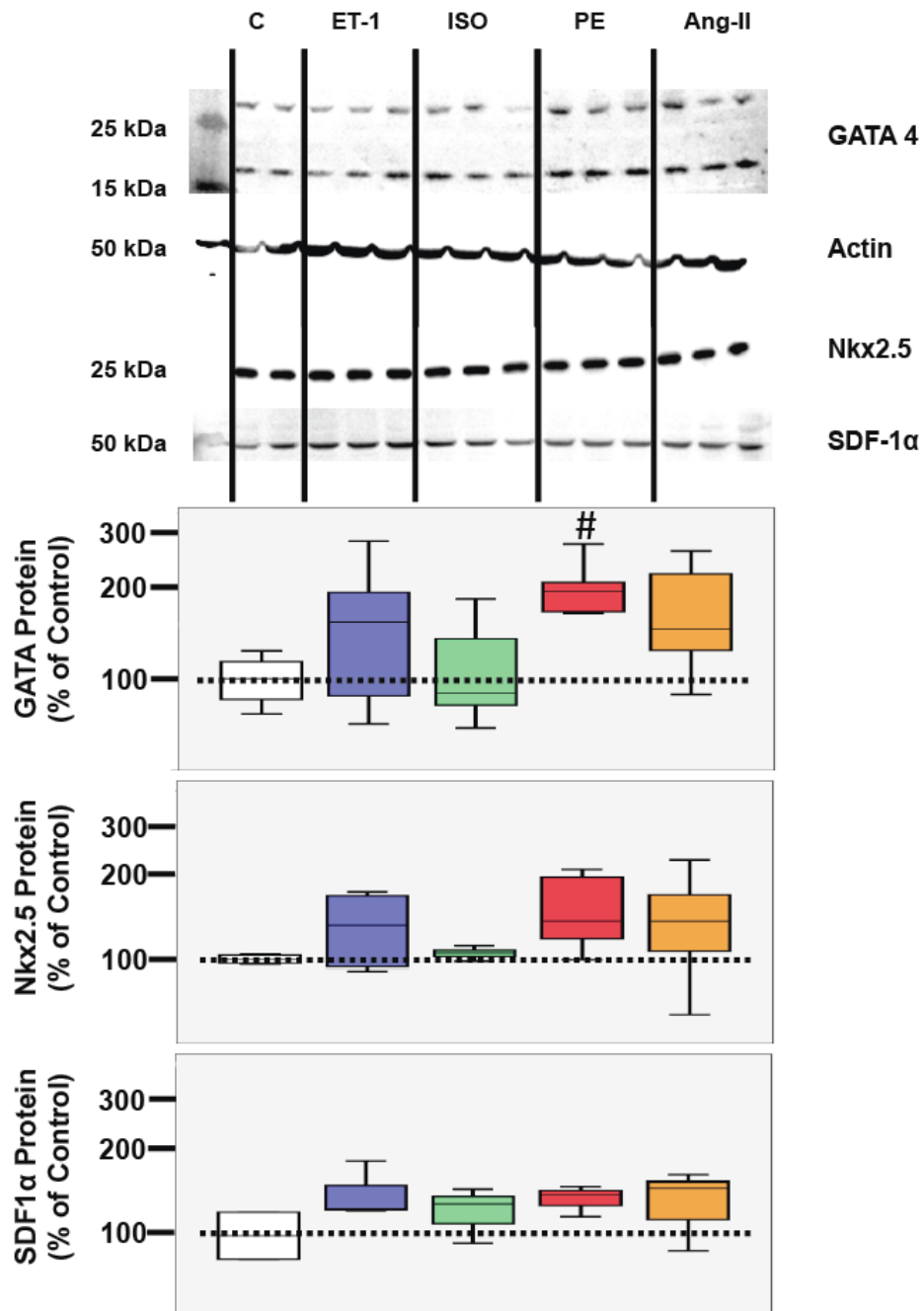


Abb. 3.8: Auswirkungen hypertropher Stimuli [Endothelin (ET, blau), Isoprenalin (ISO, grün), Phenylephrin (PE, rot), Angiotensin II (ANG-II, gelb)] auf die Proteinexpression von GATA-4, Nkx.2a und SDF-1α bei isolierten Kardiomyozyten. Die obere Abbildung zeigt die einzelnen Banden im Western Blot, die untere Abbildung die statistische Auswertung. Dargestellt sind box plots (Median und 5% – 95%-Konfidenzintervall) für die untersuchten Marker von n=6 Tieren, normiert auf die Kontrollgruppe (C, weiß, gestrichelte Linie). #,  $p < 0,05$  versus allen anderen Gruppen.

---

### **3.3. Einfluss von körperlicher Aktivität und medikamentöser Blutdrucksenkung auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern bei weiblichen spontan hypertensiven Ratten**

#### **3.3.1. Einfluss körperlicher Aktivität auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern**

Die Abbildungen 3.9a und 3.9b zeigen den Einfluss von körperlicher Aktivität (Running, R) auf die Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker im linken Ventrikel bei weiblichen spontan hypertensiven Ratten (S; Kontrollgruppe rot, Laufgruppe „R“ dunkelrot) und normotensiven Ratten (W; Kontrollgruppe weiß, Laufgruppe „R“ grau). In der Gruppe der Tiere mit langanhaltendem Hypertonus (18 Monate) kann eine erhöhte Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker durch körperliche Aktivität nachgewiesen werden.

Dies kann allerdings bei Tieren, die schon prähypertensiv (7,5 Monate) zu Laufen begannen, nicht beobachtet werden.

Bei den normotensiven Tieren findet sich keine Veränderung der molekularen Parameter durch körperliche Aktivität.



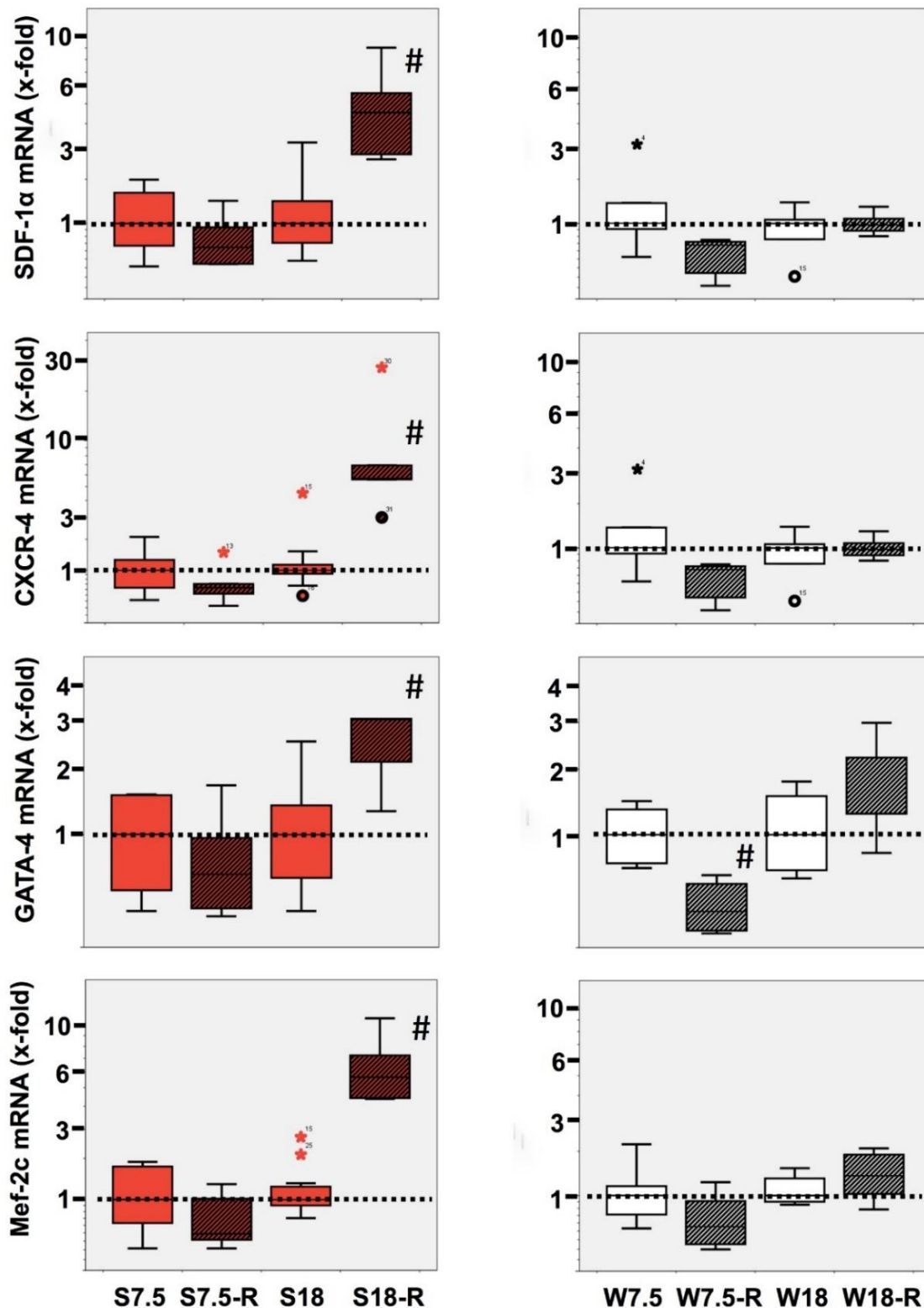


Abb. 3.9a: Einfluss körperlicher Aktivität (Running, R) auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern bei weiblichen spontan hypertensiven und normotensiven Ratten zum Zeitpunkt 7,5 Monate und 18 Monate. Dargestellt sind box plots (Median und 5% – 95%-Konfidenzintervall) für die untersuchten Marker von n=6 Tieren, normiert auf geschlechts- und altersgleiche normotensive Tiere (gestrichelte Linie). Die Werte der hypertensiven (S) Tiere sind rot, die der normotensiven (W) weiß dargestellt; die Laufgruppe (R) ist jeweils straffiert. Werte unterhalb des 5%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Kreis, Werte oberhalb des 95%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Stern abgebildet. Exakte p-Werte sind angegeben. Die Werte einzelner Tiere außerhalb der Konfidenzintervalle sind als einzelne Zahl angegeben. #,  $p < 0,05$  versus allen anderen Gruppen.

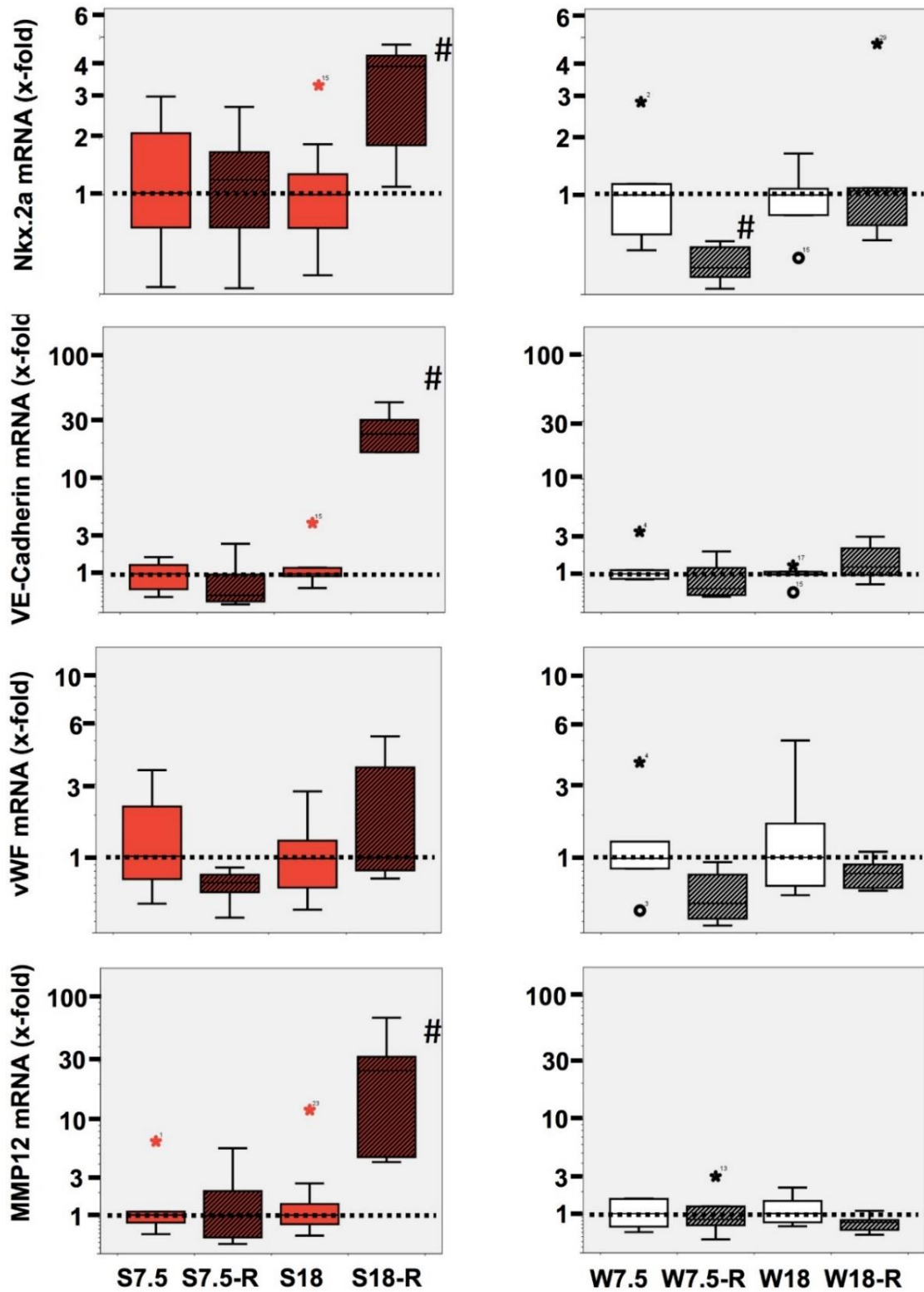


Abb. 3.9b: Einfluss körperlicher Aktivität (Running, R) auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern bei weiblichen spontan hypertensiven und normotensiven Ratten zum Zeitpunkt 7,5 Monate und 18 Monate. Dargestellt sind box plots (Median und 5% – 95%-Konfidenzintervall) für die untersuchten Marker von n=6 Tieren, normiert auf geschlechts- und altersgleiche normotensive Tiere (gestrichelte Linie). Die Werte der hypertensiven (S) Tiere sind rot, die der normotensiven (W) weiß dargestellt; die Laufgruppe (R) ist jeweils straffiert. Werte unterhalb des 5%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Kreis, Werte oberhalb des 95%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Stern abgebildet. Exakte p-Werte sind angegeben. Die Werte einzelner Tiere außerhalb der Konfidenzintervalle sind als einzelne Zahl angegeben. #,  $p < 0,05$  versus allen anderen Gruppen.

---

### **3.3.2. Einfluss des ACE-Hemmers Captopril auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern**

Abbildung 3.10 zeigt den Einfluss des ACE-Hemmers Captopril (C) auf die Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker im linken Ventrikel bei weiblichen spontan hypertensiven Ratten (S, rot) und normotensiven (W, weiß) im Alter von 18 Monaten (n=6-11). Bei den spontan hypertensiven Tieren ist eine weitere Gruppe aufgeführt („SCR“, braun), in der die beiden Therapieansätze (körperliche Aktivität + Captopril) kombiniert worden sind.

Eine Expressionssteigerung der Stammzell- und Differenzierungsmarker, wie sie durch das Laufen beobachtet werden kann, ist in den mit Captopril behandelten Gruppen nur bedingt nachzuweisen.

In der Gruppe „SCR“ (spontan hypertensive Ratten + Captopril + Running) ist die Induktion dieser Parameter vergleichbar mit den Daten aus der Laufgruppe in Abbildung 3.5.

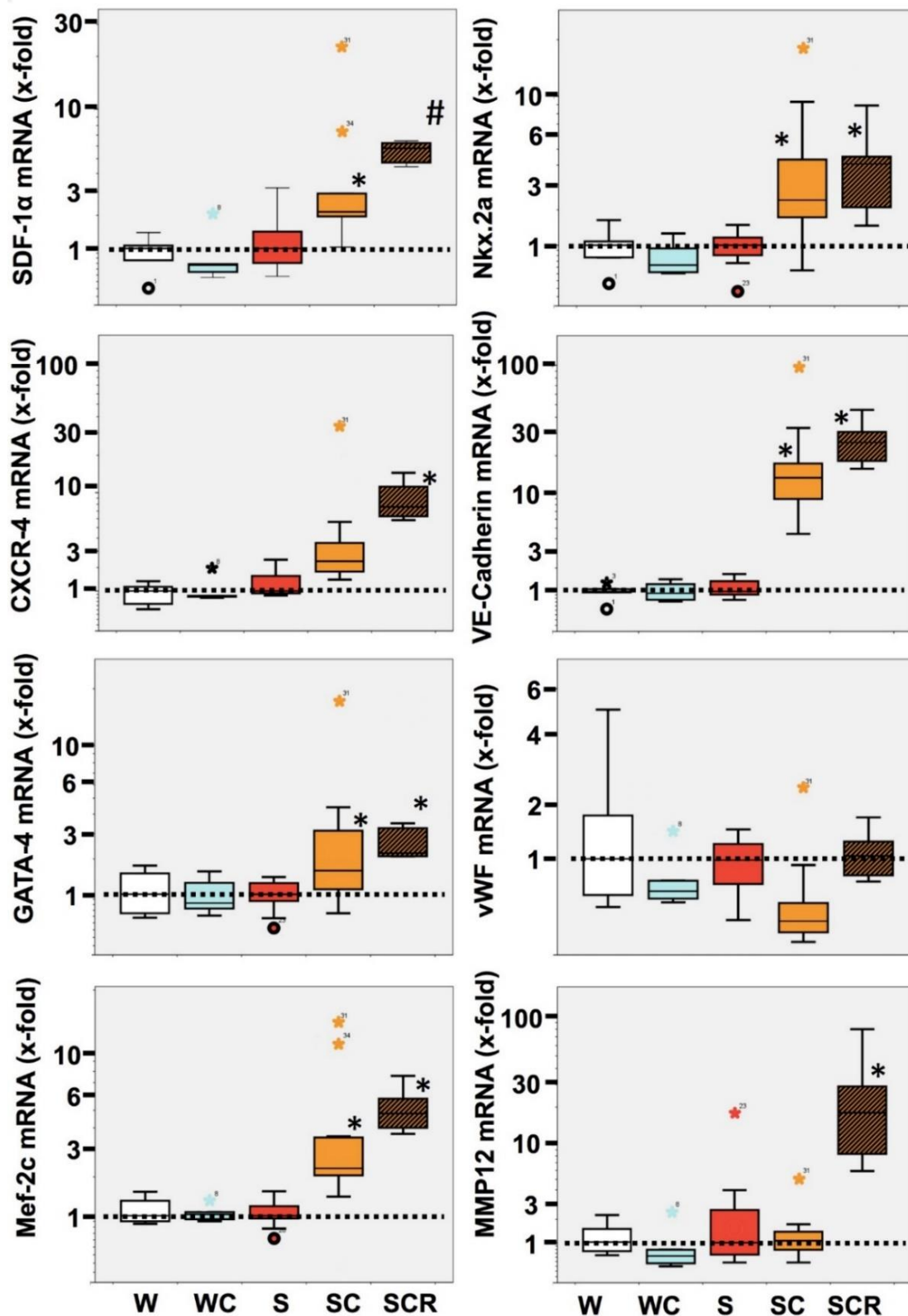


Abb. 3.10: Einfluss des Medikamentes Captopril (C) auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarker bei weiblichen spontan hypertensiven und normotensiven Ratten. [CR gibt die Kombination aus Laufen/Running (R) und Captopril (C) wieder]. Dargestellt sind box plots (Median und 5% – 95%-Konfidenzintervall) für die untersuchten Tiere von n=6 Tieren, normiert auf geschlechts- und altersgleiche normotensive Tiere (gestrichelte Linie). Werte unterhalb des 5%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Kreis, Werte oberhalb des 95%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Stern abgebildet. Die Werte einzelner Tiere außerhalb der Konfidenzintervalle sind als einzelne Zahl angegeben. \*, p<0,05 versus den normotensiven Tieren. #, p<0,05 versus allen anderen Gruppen.

### 3.4. Ergebnisse zur gewebespezifischen Lokalisation von SDF-1 $\alpha$ und weiterer induzierter Stammzell- und Differenzierungsmarker

#### 3.4.1. Vergleich isolierter Kardiomyozyten mit isolierten Nicht-Kardiomyozyten

Abbildung 3.11 zeigt die Expression von SDF-1 $\alpha$  von isolierten Kardiomyozyten im Vergleich zu der Expression von isolierten Nicht-Kardiomyozyten sowohl von spontan hypertensiven Ratten (rot, 14 Monate, n=6; 16 Monate, n=6; 18 Monate, n=6) als auch von normotensiven Ratten (weiß, 14 Monate, n=6).

Damit soll die Frage beantwortet werden, ob die gesteigerte Expression von SDF-1 $\alpha$  kardiomyozytären Ursprungs ist, wird die Expression von SDF-1 $\alpha$  isolierter Kardiomyozyten mit der von isolierten Nicht-Kardiomyozyten verglichen.

In Abb. 3.11 zeigt sich eine deutlich erhöhte Expression von SDF-1 $\alpha$  in den isolierten Nicht-Kardiomyozyten gegenüber den isolierten Kardiomyozyten in allen Altersstufen.

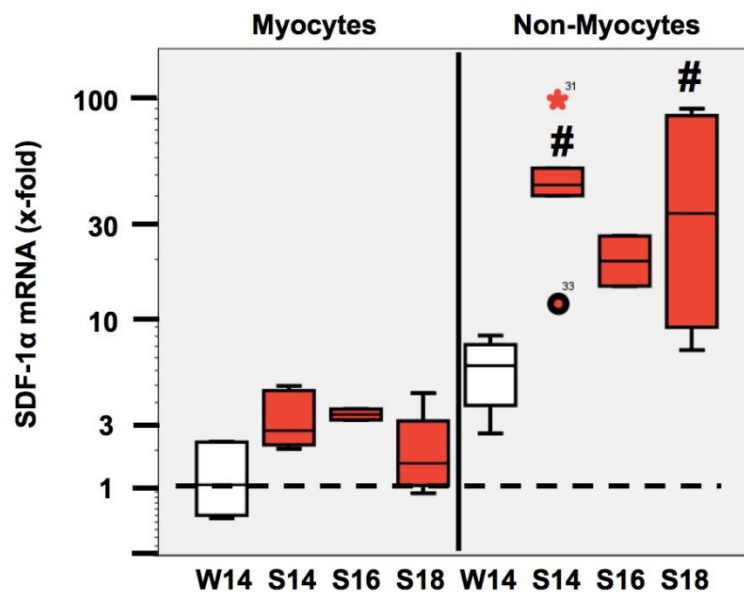


Abb. 3.11: Vergleich der Expression von SDF-1 $\alpha$  isolierter Kardiomyozyten und isolierter Nicht-Kardiomyozyten. Dargestellt sind box plots (Median und 5% – 95%-Konfidenzintervall) für die untersuchten Tiere von n=6 Schalen, normiert auf geschlechts- und altersgleiche normotensive Tiere (gestrichelte Linie). Die Werte der hypertensiven (S) Tiere sind rot, die der normotensiven (W) weiß dargestellt. Werte unterhalb des 5%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Kreis, Werte oberhalb des 95%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Stern abgebildet. Die Werte einzelner Tiere außerhalb der Konfidenzintervalle sind als einzelne Zahl angegeben. #, p<0,05 versus allen anderen Gruppen.

Abbildung 3.12 zeigt die Expression der übrigen Stammzell- und Differenzierungsmarker von isolierten Kardiomyozyten im Vergleich mit isolierten Nicht-Kardiomyozyten.

Es zeigt sich ebenfalls, dass die Expression der untersuchten Marker in der Population der isolierten Nicht-Kardiomyozyten gegenüber der Expression in den isolierten Kardiomyozyten erhöht ist (Ausnahme Nkx.2a und vWF).

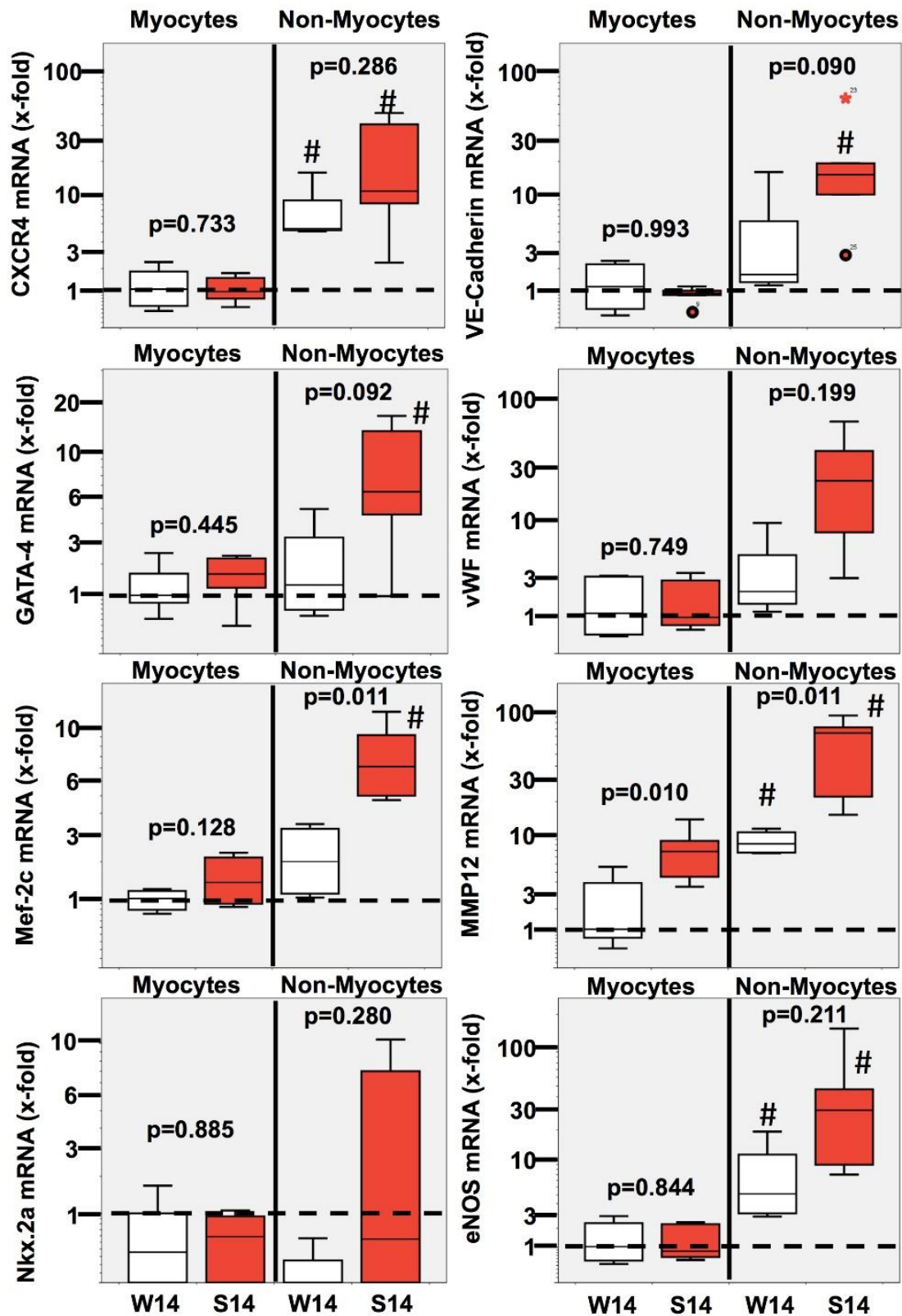


Abb. 3.12: Vergleich der Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern isolierter Kardiomyozyten und isolierter Nicht-Kardiomyozyten. Dargestellt sind box plots (Median und 5% – 95%-Konfidenzintervall) für die untersuchten Marker von n=6 Schalen, normiert auf geschlechts- und altersgleiche normotensive Tiere (gestrichelte Linie). Die Werte der hypertensiven (S) Tiere sind rot, die der normotensiven (W) weiß dargestellt. Werte unterhalb des 5%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Kreis, Werte oberhalb des 95%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Stern abgebildet. Exakte p-Werte sind angegeben. #,  $p < 0,05$  versus allen anderen Gruppen.

### 3.4.2. Nachweis von SDF-1 $\alpha$ im Plasma

Abbildung 3.13 zeigt die Konzentration von SDF-1 $\alpha$  im Plasma bei spontan hypertensiven Ratten im Alter von 11 bzw. 16 Monaten (n= 5 bzw. n=6).

Es wird der Frage nachgegangen, ob eine Erhöhung von SDF-1 $\alpha$  auf Ebene der mRNA zu einer Zunahme von SDF-1 $\alpha$  im Plasma der Tiere kommt. Die Untersuchungen der mRNA-Expression von SDF-1 $\alpha$  in Abb. 3.9 zeigt eine starke Induktion im Alter von 16 Monaten gegenüber den 11-monate alten Tieren.

SDF-1 $\alpha$  kann im Plasma nachgewiesen werden und die Konzentration von SDF-1 $\alpha$  der älteren Tiere ist im Mittel gegenüber den jungen Tieren erhöht.

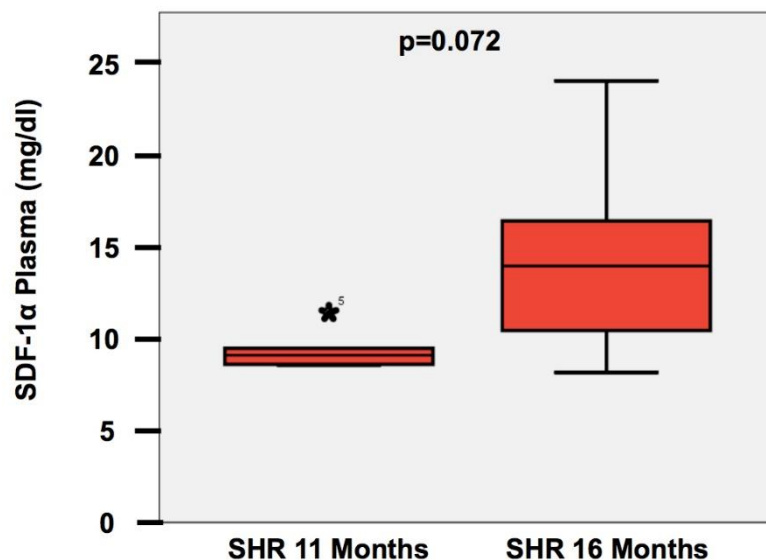


Abb. 3.13: SDF-1 $\alpha$ -Plasmakonzentration bei weiblichen spontan hypertensiven Tieren im Alter von 11 und 16 Monaten (n=6). Dargestellt sind box plots (Median und 5% – 95%-Konfidenzintervall) für die Expression von SDF-1 $\alpha$ . Werte unterhalb des 5%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Kreis, Werte oberhalb des 95%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Stern abgebildet. Die Werte einzelner Tiere außerhalb der Konfidenzintervalle sind als einzelne Zahl angegeben. Exakter P-Wert ist angegeben.



### 3.4.3. Vergleich der Expression von SDF-1 $\alpha$ an Niere und linkem Ventrikel

Abbildung 3.14 zeigt den Vergleich der Expression der Stammzellmarker SDF-1 $\alpha$  und CXCR-4 im linken Ventrikel und der Niere bei spontan hypertensiven männlichen Ratten im Alter von 18 Monaten, sowohl in der Lauf- als auch in der Kontrollgruppe.

Da die Niere wesentlich zur Regulation des Blutdruckes beiträgt, wird die links ventrikuläre Expression von SDF-1 $\alpha$  und CXCR-4 mit derjenigen in der Niere verglichen, um zu untersuchen, ob die beobachteten Effekte spezifisch für den linken Ventrikel sind. Die Expression von SDF-1 $\alpha$  ist im linken Ventrikel höher als in der Niere. Die stärkste Zunahme von SDF-1 $\alpha$  kann im linken Ventrikel in der Läufergruppe der spontan hypertensiven Tiere im Alter von 18 Monaten beobachtet werden. Eine durch das Laufen verursachte Induktion der Stammzellmarker kann in der Niere nicht nachgewiesen werden.

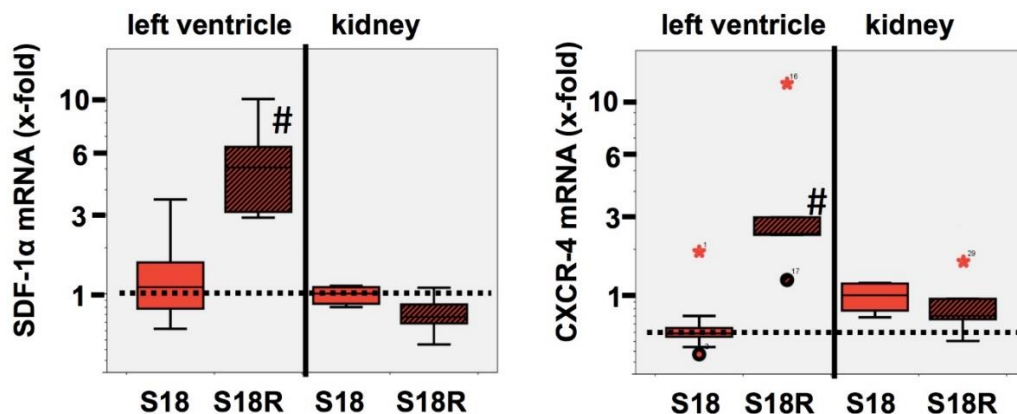


Abb. 3.14: Expression von SDF-1 $\alpha$  und Cxcr4 in linkem Ventrikel und Niere bei spontan hypertensiven Tieren im Alter von 18 Monaten, Vergleich Lauf- (n=6) und Kontrollgruppe (n=6). Dargestellt sind box plots (Median und 5% – 95%-Konfidenzintervall) für die untersuchten Marker, normiert auf geschlechts- und altersgleiche normotensive Tiere (gestrichelte Linie). Die Werte der Laufgruppe sind dunkel straffiert, die der Kontrollgruppe hell rot dargestellt. Werte unterhalb des 5%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Kreis, Werte oberhalb des 95%-Konfidenzintervalles sind einzeln als Stern abgebildet. Die Werte einzelner Tiere außerhalb der Konfidenzintervalle sind als einzelne Zahl angegeben. #, p<0,05 versus allen anderen Gruppen.

## 4. Diskussion

### 4.1. Beurteilung der Expressionsparameter der männlichen Tieren

Die vermehrte Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker (mit Ausnahme von Nkx.2a) bei spontan hypertensiven männlichen Ratten deutet auf eine vermehrte Mobilisierung von Zellen hin. Die niedrigen Expressionswerte von Nkx.2a und die massive MMP-12-Expression lassen darauf schließen, dass es sich bei den einwandernden Zellen um Makrophagen und nicht, wie angenommen, um Zellen mit kardialen Differenzierungspotenzial handelt. Makrophagen sind über die Initiierung von Entzündungsprozessen und einer Verstärkung fibrotischer Umbauprozesse an einem kardialen Remodelling beteiligt, das eine erhöhte Steifigkeit des linken Ventrikels nach sich zieht. Erhöhte Hypertrophie- und Fibroseparameter unterstützen diese Hypothese. Ein pathologisches Verhältnis der Gene des Calciumhaushaltes zueinander (Herunterregulation der SERCA, Heraufregulation des NCX) veranschaulicht die diastolische Insuffizienz, die langfristig aus der erhöhten Steifigkeit des linken Ventrikels resultieren kann.

Bei der Betrachtung der Expressionsparameter im zeitlichen Verlauf kann das erste Maximum (9. Monat) mit der Entwicklung der Hypertonie in Verbindung gebracht werden. Schon zu diesem frühen Zeitpunkt versucht das Herz, auf die sich verändernden Bedingungen zu reagieren und Zellen mit Differenzierungspotential zu mobilisieren. Bereits bestehende Einschränkungen können zu diesem Zeitpunkt von manchen Tieren noch kompensiert werden, wie funktionelle Daten zeigen (Blutdruck, LVDP, Herzfrequenz normal) (da Costa-Rebelo, 2010).

Auf eine abnehmende Expression der Marker zum 11. Monat folgt eine erneute vermehrte Expression der Marker zum 16. Monat (zweiter Peak). Auch zu diesem Zeitpunkt sollen kardiale Umbauprozesse, die auf dem Boden der Hypertonie weiter zunehmen, durch die Rekrutierung von Zellen mit Differenzierungspotenzial ausgeglichen werden. Die funktionellen Daten weisen jedoch darauf hin, dass die Kompensationsmöglichkeiten erschöpft sind (Blutdruck, LVDP, Herzfrequenz erhöht) (da Costa-Rebelo, 2010).

Jedem Maximum folgt der Tod derjenigen Tiere, die keine ausreichende Herzleistung und eine damit verbundene Versorgung des Organismus aufrechterhalten können. Die vermehrte Expression von SDF-1 $\alpha$  und der übrigen Stammzell- und Differenzierungsmarker kann also als negativer Prädiktor gewertet werden. Durch ein vermehrtes Einwandern von Zellen ergibt sich ein pathologisches kardiales Remodelling. Darauf resultiert eine verminderte Herzleistung, die sich in einer schlechten Prognose

widerspiegelt.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann daher kein therapeutisches Potenzial für einen Einsatz von Stammzellen bei hypertensiven Herzerkrankungen abgeleitet werden, wie sie beispielsweise bei einem Myokardinfarkt derzeit als nichtinvasive Therapiemöglichkeit untersucht wird (Theiss et al., 2011; Schuh et al., 2012; Bartolucci et al., 2014).

Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt sich bei einer pulmonal arteriellen Hypertonie eine vermehrte Expression von SDF-1 $\alpha$  und weiteren Chemokinen (Yang et al., 2014). Eine erhöhte SDF-1 $\alpha$  – Konzentration bei einer pulmonal arteriellen Hypertonie geht ebenfalls mit einer schlechten Prognose einher (McCullagh et al., 2015). Studien, die bei einer pulmonal arteriellen Hypertonie eine Blockade von SDF-1 $\alpha$  oder CXCR-4 einsetzten, zeigen, dass Inflammationsprozesse unterbunden werden (Yu und Hales, 2011; Savai et al., 2012). Ebenso wird die Anzahl an rekrutierten Stammzellen vermindert, wodurch pulmonale Druckverhältnisse, das vaskuläre Remodelling und hypertrophe Umbauprozesse im rechten Ventrikel verbessert werden können (Yu und Hales, 2011).

Studien zu hypertensiven Herzerkrankungen, in denen eine medikamentöse Blockade von SDF-1 $\alpha$  oder CXCR-4 untersucht werden, könnten somit weitere Aussagen über die Stellung dieser Parameter und deren prospektiven Nutzen liefern. Weiterhin sollten Studien mit Untersuchung dieser Parameter am Patienten durchgeführt werden, um die oben erhobenen Ergebnisse des Tiermodells abgleichen zu können.

#### **4.2. Beurteilung der Expressionsparameter der weiblichen Tieren**

Bei vier Monate alten weiblichen spontan hypertensiven Ratten sind, entsprechend zu den Ergebnissen der vier Monate alten spontan hypertensiven männlichen Ratten, die gleichen hypertrophen Veränderungen am linken Ventrikel in einem Frühstadium der Hypertonie zu finden, wie erhöhter Fibrose- und Hypertrophieparameter veranschaulichen. Die Theorie, dass GATA-4 an einer kardialen Hypertrophie beteiligt und sogar als initialer Trigger dafür angesehen werden kann, kann in dieser Studie bestätigt werden (Liang, et al., 2001; Oak et al., 2006).

Bei der Expression der ausgewählten Stammzell- und Differenzierungsmarker zeigen sich geschlechtsspezifische Unterschiede. Im Gegensatz zu männlichen spontan hypertensiven Ratten kann bei weiblichen spontan hypertensiven Ratten keine vermehrte Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker im Vergleich mit

normotensiven Wistar Ratten gefunden werden. Dies ist vermutlich auf den schützenden Einfluss von weiblichen Geschlechtshormonen, vor allem Östrogenen, zurückzuführen. Die Entwicklung eines höheren Blutdrucks bei männlichen Tieren kann durch das männliche Geschlechtshormon Testosteron und auch durch eine frühere Aktivierung des RAAS im Gegensatz zu weiblichen Tieren erklärt werden (Yen et al., 1974; Radin et al., 2002; Maris et al., 2005). Neben einer Herabregulierung des oxidativen Stresses schützen Östrogene vor einer kardialen Hypertrophie (Pedram et al., 2013). Weiterhin kann ein kardiales Remodelling auf der Basis von Entzündungsprozessen durch eine Inhibition von Mastzellen verhindert werden (Li et al., 2015). Die angesprochenen positiven Effekte von Östrogenen können ebenso am rechten Ventrikel bei einer pulmonal arteriellen Hypertonie nachgewiesen werden (Frump et al., 2015).

Ein biphasischer Verlauf der Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker kann bei weiblichen spontan hypertensiven Ratten nicht nachgewiesen werden. Ein Maximum um den 9. Monat (Entwicklung der Hypertonie) und ein Abfall der Expression dieser Marker um den 11. Monat werden vergleichend mit dem Expressionsverlauf der männlichen Tiere beobachtet. Dieses Maximum bezieht sich ebenfalls auf die frühe Entwicklung der Hypertonie. Dieser Punkt kann erneut mit dem Tod derjenigen Ratten gleichgesetzt werden, die keine Möglichkeiten besitzen, die aufkommenden Veränderungen auszugleichen und eine adäquate Versorgung des Organismus zu gewährleisten.

Eine späte Induktion der Stammzellmarker (zweites Maximum, 16. Monat) bleibt bei den weiblichen Ratten aus. Dies kann anhand unserer Datenlage noch nicht ausreichend geklärt werden. Studien, die neben den oben untersuchten Parametern Hormonprofile miteinbeziehen, liegen derzeit noch nicht vor. Diese könnten jedoch weitere Auskünfte darüber liefern, welchen speziellen Einfluss weibliche Geschlechtshormone auf die Mobilisierung von Zellen mit Differenzierungspotenzial und gesondert auf die Expression der oben untersuchten der Stammzell- und Differenzierungsmarker ausüben. Auch an dieser Stelle müssen Studien mit Untersuchung dieser Parameter am (weiblichen) Patienten folgen, um nähere Auskünfte über die oben angesprochenen Stammzell- und Differenzierungsmarker zu erhalten.

### **4.3. Beurteilung des Einflusses von körperlicher Aktivität und medikamentöser Blutdrucksenkung auf die Expression der Stamm- und Differenzierungsmarker**

#### **4.3.1. Körperliche Aktivität**

Eine vermehrte Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker unter körperlicher Aktivität zeigt, dass sportliche Betätigung zu einer vermehrten Mobilisation von Zellen führt. Eine massive Expression von MMP-12 und eine geringe Expression von Nkx.2a unter körperlicher Aktivität unterstützen die oben dargelegte Hypothese, dass vermehrt Makrophagen in das Herz einwandern und fibrotische Umbauprozesse verstärken. Es scheint, dass Zellen mit Regenerationspotential hingegen nicht mobilisiert werden.

Ähnliche Studien zeigen, dass eine vermehrte sportliche Betätigung von Tieren mit einem etablierten Hypertonus mit einer schlechten Prognose einhergeht (Schultz et al., 2007; da Costa-Rebelo, 2010). Daher sollte Patienten mit etabliertem Hypertonus von übermäßiger körperlicher Aktivität abgeraten werden. Auf Grund der oben angesprochenen positiven Effekte sollte jedoch ein moderates Ausdauertraining weiterhin empfohlen werden, wie es derzeit in den Leitlinien der DHL aufgeführt wird (DHL, Stand 2008).

Bei Tieren, die prähypertensiv (im Alter von 1,5 Monaten) einer erhöhten körperlichen Aktivität ausgesetzt wurden, kann keine Induktion dieser Parameter beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass körperliche Aktivität bereits in jungen Jahren, d.h. vor Entwicklung einer Hypertonie, in Bezug auf die Rekrutierung von Zellen einen positiven Einfluss ausübt. Damit sollten gezielt Sportprogramme für Kinder und Jugendliche als Primärprävention ausgearbeitet und umgesetzt werden, wie es derzeit von mehreren Krankenkassen in Angriff genommen wird.

Es muss erneut daraufhin gewiesen werden, dass die ausgewählten Stammzell- und Differenzierungsmarker in dieser Studie nur im Tiermodell untersucht wurden und damit nur eine begrenzte Aussagekraft besitzen. Weitere Studien müssen angeschlossen werden, in denen eine Analyse dieser Parameter am Patienten vorgenommen wird, um weitere Aussagen bezüglich des Einflusses von körperlicher Aktivität und einer Langzeitprognose treffen zu können.

#### **4.3.2. Medikamentöse Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems**

Die Hemmung des RAAS mittels Captopril führt zu einer funktionellen Verbesserung der Herzleistung, die sich in einer Senkung des Blutdruckes, der Herzfrequenz und des linksventrikulären diastolischen Druckes bemerkbar macht (da Costa-Rebelo, 2010). Die

fehlende Induktion der Stammzell- und Differenzierungsparameter unter der Behandlung mit Captopril lässt darauf schließen, dass die Anzahl einwandernder Zellen vermindert wird. Wie oben bereits erwähnt, werden fibrotische, hypertrophe und apoptotische Umbauprozesse können durch medikamentöse Blockaden des RAAS verzögert (Yu et al., 2002; Lijnen, Petrov, 2003; Susic et al., 2007). Durch eine Normalisierung der Gene des Calciumhaushaltes (Verhältnis SERCA / NCX) zueinander kann linksventrikuläre Pumpfunktion verbessert werden (Xu et al., 2005). Somit können über eine medikamentöse Blockaden des RAAS mittels eines ACE-Hemmers die oben angesprochenen schädigenden Einflüsse auf das Herz abgefangen werden und damit die Langzeitüberlebensraten verbessert werden (Wollert, Drexler, 1999). Daraus kann geschlossen werden, dass ein ACE-Hemmer in jeder Zweifachkombination bei der Therapie der arteriellen Hypertonie enthalten sein sollte, sofern keine Kontraindikationen vorliegen.

Eine Expressionsabschwächung von SDF-1 $\alpha$  und der übrigen Marker kann in der Gruppe, die beiden Therapieansätzen ausgesetzt war, nicht beobachtet werden. Hier zeigt sich eine Induktion der Parameter, die mit den Ergebnissen der Laufgruppe vergleichbar ist.

Die Induktion der Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarker durch körperliche Aktivität kann durch die Kombination mit einer Hemmung des RAAS nicht aufgehoben werden. Dies spricht dafür, dass körperliche Aktivität einen größeren Einfluss auf die Expression dieser Marker zu haben scheint als die medikamentöse Therapie mit einem ACE-Hemmer. Dies appelliert noch ein einmal an die Durchsetzung primärpräventiver Sportprogramme, da eine körperliche Aktivität vor Entwicklung einer arteriellen Hypertonie einen positiven Einfluss ausübt, indem die Induktion der oben angesprochenen Marker unterdrückt wird.

Wiederum muss darauf aufmerksam gemacht werden, dass weitere Studien am Patienten durchgeführt werden sollten, um die Frage zu beantworten, ob gleichartige Effekte wie im Tierversuch beobachtet werden können und um genauere Angaben zu diesen Parameter und deren Verhalten unter körperlicher Aktivität und medikamentöser Blutdrucksenkung machen zu können.

#### 4.4. Beurteilung der Gewebespezifität von SDF-1 $\alpha$

Die erhöhte Expression von SDF-1 $\alpha$  und der übrigen Stammzell- und Differenzierungsmarker bei isolierten kardialen Nicht-Myozyten unterstützt die oben angesprochene Hypothese, dass es sich bei den kardialen Nicht-Myozyten um eingewanderte Zellen handelt.

Unter Berücksichtigung der starken Expression von MMP-12 führt die Expression von SDF-1 $\alpha$  somit nicht zu einer Rekrutierung von Zellen mit Regenerationspotential, sondern zu einer Mobilisierung von Makrophagen, die über fibrotische Umbauprozesse eine diastolische Insuffizienz begünstigen.

Die erhöhten Plasmawerte von SDF-1 $\alpha$  sprechen für einen erhöhten Anteil an rekrutierten Zellen im Blut, haben jedoch keine Aussagekraft über die Art der Zellen. Genauere Angaben über den Charakter dieser Zellen könnte eine FACS-(Fluorescence-activated cell sorting)-Analyse liefern, bei welcher Zellen über die Bestimmung von Oberflächenantigenen (CD-Antigene) näher untersucht und differenziert werden können.

Die fehlende Induktion der Stammzell- und Differenzierungsmarker in den Nierengewebeproben spricht dafür, dass eine Rekrutierung von Zellen über die SDF-1 $\alpha$  – CXCR-4 – Achse bei hypertensiven Herzerkrankungen spezifisch für das linke Herz zu sein scheint. Analog zu einem Myokardinfarkt kann bei einem akuten Niereninfarkt eine Einwanderung von Zellen über das SDF-1 $\alpha$  – CXCR-4 – System in das infarzierte Areal gefunden werden, nicht aber bei hypertensiven Herzerkrankungen (Liu et al., 2013). Eine Hochregulierung von SDF-1 $\alpha$  in der Niere ist ebenfalls mit einer Einwanderung von Makrophagen assoziiert (Wan et al., 2014). Studien, die eine medikamentöse Blockade von CXCR-4 einsetzen, verweisen auf eine weitere therapeutische Option, um ein akutes Nierenversagen zu vermeiden (Zuk et al., 2014). Studien, die die Expression der oben angesprochenen Marker von dem rechten Ventrikel und der Lunge miteinbeziehen, können genauere Hinweise über die Gewebespezifität von SDF-1 $\alpha$  und CXCR-4 liefern.

#### 4.5. Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann in dieser Studie eine Stimulierung des SDF-1 $\alpha$  – CXCR4 – Systems als Hinweis auf eine Zellmobilisation nachgewiesen werden. Ein selbstregeneratives Potential bei hypertensiven Herzerkrankungen über diese Achse kann jedoch nicht gefunden werden.

Eine massive Expression von MMP-12 und eine niedrige Expression von Nkx.2a deuten darauf hin, dass Makrophagen und nicht, wie zuvor angenommen, Zellen mit Regenerationspotential in das Herz einwandern. Fibrotische Umbauprozesse gehen mit einer erhöhten Steifigkeit des Herzens und einer schlechteren Prognose einher. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression von SDF-1 $\alpha$  und weiterer Stammzell- und Differenzierungsmarker liefern nur Ansatzpunkte und fordern weitere Untersuchungen unter Miteinbeziehung von Hormonprofilen.

Körperliche Aktivität verstärkt die Expression von SDF-1 $\alpha$  und weiterer Stammzell- und Differenzierungsmarker, so dass Patienten mit etabliertem Hypertonus von exzessiver körperlicher Aktivität abgeraten werden sollte. Moderates Ausdauertraining vor Entwicklung der arteriellen Hypertonie hingegen scheint positive Auswirkung auf die Mobilisation der Stammzell- und Differenzierungsmarker zu nehmen.

Die medikamentöse Hemmung des RAAS mittels Captopril führt neben einer funktionellen Verbesserung der Herzleistung zu einer Abschwächung der Expression von SDF-1 $\alpha$ . Demnach sollte ein ACE-Hemmer in der Therapie der arteriellen Hypertonie enthalten sein, sofern keine Kontraindikationen bestehen.

In der Kombination beider Ansätze zeigt sich ein größerer Effekt auf die Mobilisation der Stammzell- und Differenzierungsmarker durch körperlichen Aktivität, wodurch primär präventiven Sportprogrammen größere Aufmerksamkeit gewidmet werden sollte. Anhand von Untersuchungen von Plasma- und Nierengewebeproben kann dargestellt werden, dass bei hypertensiven Herzerkrankungen eine Rekrutierung von Zellen über das SDF-1 $\alpha$  – CXCR-4 – System spezifisch für das Herz zu sein scheint. Eine größere Aussagekraft kann durch Studien, die den rechten Ventrikel und die Lunge dieser Tiere untersucht, erreicht werden.



## 5. Zusammenfassung

In Studien zum Herzinfarkt konnte gezeigt werden, dass Stammzellen über das SDF-1 $\alpha$  – CXCR-4 – System an kardialen Reparaturmechanismen beteiligt sind. In der vorgelegten Arbeit wurde untersucht, ob diese Faktoren auch bei hypertensiven Herzerkrankungen ein selbstregeneratives Potenzial unterstützen.

Dazu wurden Gewebeproben des linken Ventrikels von 81 spontan hypertensiven Ratten im Vergleich zu 55 normotensiven Wistar Ratten mittels quantitativer Real-time PCR, Immunoblots und ELISA untersucht. Neben der Expression kardialer Marker druckinduzierter Umbauprozesse wurde die Expression ausgewählter Stammzell- und Differenzierungsmarker analysiert. Weiterhin wurden Auswirkungen aktueller Therapieansätze (körperliche Aktivität, medikamentöse ACE-Hemmung mittels Captopril) auf die Expression dieser Faktoren untersucht. Zur Abklärung der Gewebespezifität der sezernierten Stammzell- und Differenzierungsmarker wurden Plasma- und Nierengewebeproben herangezogen. An isolierten Kardiomyozyten bzw. kardialen Nicht-Myozyten wurde die Expression von SDF-1 $\alpha$  genauer betrachtet.

Bei männlichen spontan hypertensiven Ratten zeigte sich ein biphasischer Verlauf der Expression von SDF-1 $\alpha$  und CXCR-4. Körperliche Aktivität führte zu einer verstärkten Induktion dieser Parameter. Bei Tieren, die schon prähypertensiv einer erhöhten körperlichen Aktivität ausgesetzt wurden, konnte dies nicht beobachtet werden. Captopril führte zu einer funktionellen Verbesserung der Herzleistung, zeigte aber keine Induktion der Expression von SDF-1 $\alpha$  und CXCR-4. SDF-1 $\alpha$  konnte im Plasma nachgewiesen werden und wurde überwiegend von kardialen Nicht-Myozyten sezerniert. Eine Induktion von SDF-1 $\alpha$  konnte an der Niere nicht beobachtet werden.

Auf Grund einer fehlenden Induktion von Nkx.2a und einer sehr starken Expression von MMP-12 kann die Hypothese aufgestellt werden, dass es sich bei den eingewanderten Zellen um Makrophagen handelt. Diese können einen Inflammationsprozess hervorrufen bzw. verstärken. Sie verschieben das Gleichgewicht von Collagen und Elastin zugunsten des Collagens. Daraus resultiert eine erhöhte Steifigkeit des linken Ventrikels, die Füllungsprobleme am Herzen bis hin zu einer diastolischen Herzinsuffizienz nach sich ziehen kann.

In dem hier verwendeten Modell zur Untersuchung der Hypertonie ist das SDF-1 $\alpha$  – CXCR-4 – System ein Indikator für die Rekrutierung von Makrophagen. Ein regeneratives Potenzial bei hypertensiven Herzerkrankungen wurde nicht gefunden.

---

## 6. Summary

Recent studies concerning ischaemic heart disease have illustrated that circulating stem cells can be involved in cardiac repair mechanisms via the SDF-1 $\alpha$  – CXCR4 – axis. In the presented study we examined if those factors also contain a regenerative potential in hypertensive cardiac diseases.

In addition to markers indicating pressure-induced remodelling, the expression of stem cell and differentiation markers in samples of the left ventricle of 81 spontaneous hypertensive rats and 55 normotensive Wistar rats were investigated using quantitative real-time PCR, immunoblots and ELISA. Furthermore, the effect of standard therapy approaches (physical activity, pharmaceutical inhibition of RAAS with Captopril) on the before mentioned markers were monitored. To detect tissue specificity of the secreted factors, samples of plasma and the kidney were analysed, as well as expression of SDF-1 $\alpha$  in myocytes and non-myocytes was investigated in particular.

Male spontaneous hypertensive rats showed a bi-phasic behaviour for expression of SDF-1 $\alpha$  and CXCR-4. With increased physical activity, expression of SDF-1 $\alpha$  and CXCR-4 increased in animals with continuous hypertension. This could not be detected for animals that had been treated with physical activity before development of hypertension. Captopril led to functional improvement and decreased blood pressure but had no effect on expression levels of SDF-1 $\alpha$  and CXCR-4. SDF-1 $\alpha$  could be detected in plasma samples, and was secreted predominantly by non-myocytes. Increased expression of SDF-1 $\alpha$  due to running could not be found in the kidney.

Because the expression of Nkx.2a was significantly decreased and the expression of MMP-12 significantly increased for rats, the hypothesis seems plausible, that the non-myocytes are indeed macrophages, which invade and facilitate the inflammation process in the hypertensive heart. Additionally, the balance of collagen and elastin fibres shifts in favour of collagen, which causes increased stiffness of the left ventricle leading to problems with filling the heart and diastolic heart failure.

The SDF-1 $\alpha$  – CXCR4 system seems to be an indicator for the recruitment of macrophages in this used model of essential hypertension. It does not indicate a regenerative potential in hypertensive cardiac diseases.

---

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin – Converting - Enzyme
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
B2M	$\beta$ 2-Mikroglobulin
BPB	Bromphenol
BNP	Brain natriuretisches Peptid
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Captopril
Ca	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CCT	Carnithin Creatinin Taurin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CXCR-4	Chemokine receptor type 4
°C	Grad Celsius
Darst.	Darstellung
d.h.	das heißt
DHL	Deutsche Hochdruckliga
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidphosphat
DTT	Dithiotretol
ECL	Enhanced Chemilumineszenz Detektion
ECM	Extrazelluläre Matrix
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
ESC	European Society of Cardiology

---

ESH	European Society of Health
ET	Endothelin
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA-4	Transkriptionsfaktor, der an die DNA-Sequenz GATA-4 bindet
h	Stunde
HCL	Chlorwasserstoff
HDL	Hochdruckliga
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
Ig	Immunglobulin
ISO	Isoprenalin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzerkrankung
l	Liter
LV	Linker Ventrikel
LVDP	linksventrikulärer entwickelter Druck
M	Mol/l
Mef-2c	Myocyte-specific enhancer factor 2
mg	Milligramm
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter

---

mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MMP-12	Matrix-Metalloprotease 12
mol	Mol
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NaCl	Natrium Chlorid
NCX	Natrium-Calcium-Exchanger
Nkx.2a	Homoboxprotein des Gens Nkx.2a
ODC	Ornithin-Dexocarboxylase
Oligo-dt	Oligo-desoxy-Thymidin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phenylephrin
pH	negative dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PLB	Phospholamban
PROCAM	Prospective Cardiovascular Münster Studie
R	Running /Laufgruppe
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute /Umdrehung pro Minute
SD	Standardabweichung

---

SDF-1 $\alpha$ / CXCL-12	Stromal cell derived factor 1 $\alpha$ / CXC Motive chemokine 12
sec	Sekunde
SERCA	Sarkoplasmatische Reticulum Ca-ATPase
SHR	spontan hypertensive Ratten
TBS	Tris buffered saline
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor $\beta$ 1
Tris	Tris-hydroxymethylamiononethan
V	Volt
VE-Cadherin	Vascular endothelial cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth factor
vWF	von Willebrand Faktor
W	Wistar rats
WHO	World Health Organisation

## 8. Darstellungsverzeichnis

### 8.1. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Kategorien der arteriellen Hypertonie	1
Tab. 1.2.	Zielblutdruckwerte für die arterielle Hypertonie	3
Tab. 2.1.	PCR-Programm iCycler	23

### 8.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.3	Empfohlene Zwei- und Dreifachkombination in der Therapie der arteriellen Hypertonie	4
Abb. 3.1:	Expression kardialer Marker druckinduzierter Umbauprozesse am linken Ventrikel von vier Monate alten männlichen spontan hypertensiven Ratten	35
Abb. 3.2:	Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarken bei vier Monate alten männlichen spontan hypertensiven und normotensiven Wistar Ratten	36
Abb. 3.3:	Zeitlicher Verlauf der Stammzell- und Differenzierungsmarker bei männlichen spontan hypertensiven Tieren	38
Abb. 3.4:	Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker bei 11 Monate alten männlichen spontan hypertensiven und normotensiven Tieren	39
Abb. 3.5:	Expression der Hypertrophieparameter bei weiblichen Tieren im Vergleich zu normotensiven im zeitlichen Verlauf	40
Abb. 3.6:	Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker bei weiblichen prähypertensiven Tieren im Vergleich zu normotensiven Tieren im zeitlichen Verlauf	42
Abb. 3.7:	Zeitlicher Verlauf der Stammzell- und Differenzierungsmarker bei weiblichen prähypertensiven Tieren	44
Abb. 3.8:	Auswirkungen hypertropher Stimuli auf die Proteinexpression von GATA-4, Nkx.2a und SDF-1 $\alpha$ bei isolierten Kardiomyozyten	46
Abb.3.9a:	Einfluss körperlicher Aktivität auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern bei weiblichen	

---

	spontan hypertensiven und normotensiven Ratten zum Zeitpunkt 7,5 Monate und 18 Monate	48
Abb.3.9b:	Einfluss körperlicher Aktivität auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern bei weiblichen spontan hypertensiven und normotensiven Ratten zum Zeitpunkt 7,5 Monate und 18 Monate	49
Abb.3.10:	Einfluss des Medikamentes Captopril auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarker bei weiblichen spontan hypertensiven und normotensiven Tieren	51
Abb.3.11:	Vergleich der Expression von SDF-1 $\alpha$ isolierter Kardiomyozyten und isolierter Nicht-Kardiomyozyten	52
Abb.3.12:	Vergleich der Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern isolierter Kardiomyozyten und isolierter Nicht-Kardiomyozyten	54
Abb.3.13:	SDF-1 $\alpha$ -Plasmakonzentration bei weiblichen spontan hypertensiven Tieren	55
Abb.3.14:	Expression von SDF-1 $\alpha$ und CXCR-4 in linkem Ventrikel und Niere bei spontan hypertensiven Tieren im Alter von 18 Monaten, Vergleich Lauf- (n=6) und Kontrollgruppe (n=6)	56



## 9. Literaturverzeichnis

Agarwal, D.; Welsch, M.A.; Keller, J.N.; Francis, J.:

*“Chronic exercise modulates RAS components and improves balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the brain of SHR.”*

Basic Res Cardiol (2011); 106(6): 1069-85.

Akazawa, H.; Komuro, I.:

*“Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: its role in cardiac development and diseases.”*

Pharmacol Ther (2005); 107(2): 252-68.

Asahi, M.; Nakayama, H.; Tada, M.; Otsu, K.:

*“Regulation of sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> adenosine triphosphatase by phospholamban and sarcolipin: implication for cardiac hypertrophy and failure.”*

Trends Cardiovasc Med (2003); 13(4): 152-7.

Bartolucci, J.; Verdugo, F.J.; Larrea, R.; Carrión, F.; Lamich, R.; Pedreros, P.; Delgado, M.; Sanhueza, P.; Khoury, M.; Figueroa, F.E.:

*„Stem cells for the treatment of cardiovascular diseases. An update.”*

Rev Med Chil (2014); 142(8): 1034-46.

Baguet, J.P.:

*“Hypertension during obstructive sleep apnea syndrome.”*

Rev Prat. (2015); 65(6):830-3.

Bental, T.; Lishner, M.; Lalkin, A.; Elis, A.; Ravid, M.:

*“Comparison of enalapril to captopril by 24-hour ambulatory blood pressure monitoring.”*

J Clin Pharmacol (1997); 37(6): 514-9.

Bers, D.M.:

*“Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes.”*

Front Biosci (2002); 7: 1697-711.

Beuckelmann, D.J., Näbauer, M., Erdmann, E.:

*“Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure.”*

Circulation (1992); 85(3):1046-55.

Bocalini, D.S.; Carvalho, E.V.; de Sousa, A.F.; Levy, R.F.; Tucci, P.J.:

*“Exercise training-induced enhancement in myocardial mechanics is lost after 2 weeks of detraining in rats.”*

Eur J Appl Physiol (2010); 109(5): 909-14.

Campbell, S.E., Katwa, L.C.:

*„Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts.”*

J Mol Cell Cardiol (1997); 29(7): 1947-58.

Carneiro-Júnior, M.A.; Prímola-Gomes, T.N.; Quintão-Júnior, J.F.; Drummond, L.R.; Lavorato, V.N.; Drummond, F.R.; Felix, L.B.; Oliveira, E.M.; Cruz, J.S.; Natali, A.J.; Mill, J.G.:

*“Regional effects of low-intensity endurance training on structural and mechanical properties of rat ventricular myocytes.”*

J Appl Physiol (2013); 115(1): 107-15.

Carnicelli, V.; Frascarelli, S.; Ghelardoni, S.; Ronca-Testoni, S.; Zucchi, R.:

*“Short-term effects of pressure overload on the expression of genes involved in calcium homeostasis.”*

Mol Cell Biochem (2008); 313(1-2): 29-36.

Cavalera, M.; Frangogiannis, N.G.:

*“Targeting the chemokines in cardiac repair.”*

Curr Pharm Des (2014); 20(12): 1971-9.

Chen, Q., Jin, M., Yang, F., Zhu, J., Xiao, Q., Zhang, L.:

*“Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling.”*

Mediators Inflamm (2013); 928315.

Cingolani, H.E., Rebolledo, O.R., Portiansky, E.L., Pérez, N.G., Camilión, de Hurtado, M.C.: *“Regression of hypertensive myocardial fibrosis by Na(+)/H(+) exchange inhibition.”*

Hypertension (2003); 41(2): 373-7.

Cohen, J.B., Cohen, D.L.:

*„Cardiovascular and renal effects of weight reduction in obesity and the metabolic syndrome.”*

Curr Hypertens Rep. (2015); 17(5):34.

Comte-Perret, S.; Giusti, V.; Wuerzner G.:

*“Treatment of hypertension in obese patients.”*

Rev Med Suisse (2013); 9(397): 1622, 1624-6.

Cory, C.R., McCutcheon, L.J., O'Grady, M., Pang, A.W., Geiger, J.D., O'Brien, P.J.:

*“Compensatory downregulation of myocardial Ca channel in SR from dogs with heart failure.”*

Am J Physiol. (1993); 264:H926-37.

Creemers, E.E., Cleutjens, J.P., Smits, J.F., Daemen, M.J.:

*“Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?”*

Circ Res (2001); 89(3): 210-10.

De Araújo Rodrigues, N.L., de Oliveira Lima, L.H., de Sousa Carvalho, E., de Sousa Vera, P.V., de Macêdo Gonçalves Frota, K., de Oliveira Lopes, M.V., Rodrigues Oliveira, E.A.:

*“Risk factors for cardiovascular diseases in adolescents.”*

Invest Educ Enferm. (2015); 33(2):315-24.

Da Costa-Rebelo, R.M.:

*„Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Progredienz hochdruckvermittelter Herzinussfizienz bei hypertensiven Ratten.”*

(2010)

De Bold, A.J.; Ma, K.K.; Zhang, Y.; de Bold, M.L.; Bensimon, M.; Khoshbaten, A.:  
*“The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart.”*

Can J Physiol Pharmacol (2001); 79(8): 705-14.

Deutschen Hochdruckliga (DHL): Homepage [www.dhl.de](http://www.dhl.de)

Do Prado Junior, P.P., de Faria, F.R., de Faria, E.R., Franceschini Sdo, C., Priore, S.E.:

*“Cardiovascular risk and associated factors in adolescents.”*

Nutr Hosp. (2015); 32(2):897-904.

Donazzan, L., Mahfoud, F., Ewen, S., Ukena, C., Cremers, B., Kirsch, C.M., Hellwig, D., Eweiri, T., Ezziddin, S., Esler, M., Böhm, M.:

*“Effects of catheter-based renal denervation on cardiac sympathetic activity and innervation in patients with resistant hypertension.”*

Clin Res Cardiol. (2015)

Dong, F; Harvey, J.; Finan, A.; Weber, K.; Agarwal, U.; Penn, M.S.:

*“Myocardial CXCR4 expression is required for mesenchymal stem cell mediated repair following acute myocardial infarction.”*

Circulation (2012); 126(3): 314-24.

Edes, I.; Kranias, E.G.:

*“Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum function by phospholamban.”*

Membr Biochem (1988); 7(3): 175-92

Erkasap, N.:

*“SERCA in genesis of arrhythmias: what we already know and what is new?”*

Anadolu Kardiyol Derg (2007); 1: 43-6.

European Society of Cardiology (ESC): Homepage [www.escardio.org](http://www.escardio.org)

European Society of Hypertension (ESH): Homepage [www.eshonline.org](http://www.eshonline.org)

---

Fang, P., He, B., Shi, M., Zhu, Y., Bo, P., Zhang, Z.:

*“Crosstalk between exercise and galanin system alleviates insulin resistance.”*

Neurosci Biobehav Rev. (2015); 59:141-146.

Fernandes, T.; Nakamuta, J.S.; Magalhães, F.C.; Roque, F.R.; Lavini-Ramos, C.;

Schettert, I.T.; Coelho, V.; Krieger, J.E.; Oliveira, E.M.:

*“Exercise training restores the endothelial progenitor cells number and function in hypertension: implications for angiogenesis.”*

J Hypertens (2012); 30(11): 2133-43.

Frump, A.L.; Goss, K.N.; Vayl, A.; Albrecht, M.; Fisher, A.; Tursunova, R.; Fierst, J.;

Whitson, J.; Cucci, A.R.; Brown, M.B.; Lahm, T.:

*“Estradiol improves right ventricular function in rats with severe angioproliferative pulmonary hypertension: effects of endogenous and exogenous sex hormones.”*

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2015); 308(9): 873-90.

Fuller, W.; Eaton, P.; Bell, J.R.; Shattock, M.J.:

*„Ischemia-induced phosphorylation of phospholemman directly activates rat cardiac Na/K-ATPase.”*

FASEB J (2004); 18(1): 197-9.

Gaggin, H.K.; Januzzi, J.L. jr.:

*“Biomarkers and diagnostics in heart failure.”*

Biochim Biophys Acta (2013); 1832(12): 2442-50.

Garciaarena, C.D., Pinilla, O.A., Nolly, M.B., Laguens, R.P., Escudero, E.M., Cingolani, H.E., Ennis, I.L.:

*”Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy.”*

Hypertension. 2009 Apr;53(4):708-14.

Gohlke, H. :

*“Primary prevention of coronary artery disease: is there a role for risk scores?”*

Herz (2012); 37(1): 75-80.

Gosse, P.:

*„Left ventricular hypertrophy as a predictor of cardiovascular risk.“*

J Hypertens Suppl. (2005); 23(1): 27-33.

Groha, P.; Kufner, S.; Ott, I.; Schunkert, H.:

*„New ESH/ESC guidelines on arterial hypertension: what is new and what indications remain for renal denervation?“*

Herz (2014); 39(8): 952-6.

Göbel, W.; Matlach, J.:

*„Hypertensive changes oft he fundus.“*

Ophthalmologe (2013); 110(10): 995-1005.

Grassi, G., Seravalle, G., Quarti-Trevano, F.:

*“The 'neuroadrenergic hypothesis' in hypertension: current evidence.“*

Exp Physiol. (2010); 95(5):581-6.

Harada, M. et al. Harada, M.; Saito, Y.; Nakagawa, O.; Miyamoto, Y.; Ishikawa, M.; Kuwahara, K.; Ogawa, E.; Nakayama, M.; Kamitani, S.; Hamanaka, I.; Kajiyama, N.; Masuda, I.; Itoh, H.; Tanaka, I.; Nakao, K.:

*“Role of cardiac nonmyocytes in cyclic mechanical stretch-induced myocyte hypertrophy.“*

Heart Vessels (1997); 198-202.

Heimer, R.; Bashey, R.I.; Kyle, J.; Jimenez, S.A.:

*“TGF-beta modulates the synthesis of proteoglycans by myocardial fibroblasts in culture.“*

J Mol Cell Cardiol (1995); 27(10): 2191-8.

He, F.J., Li, J., Macgregor, G.A.:

*“Effect of longer term modest salt reduction on blood pressure: Cochrane systematic review and meta-analysis of randomised trials.“*

BMJ. (2013); 346:f1325.

He, H.; Giordano, F.J.; Hilal-Dandan, R.; Choi, D.J.; Rockman, H.A.; McDonough, P.M.; Bluhm, W.F.; Meyer, M.; Sayen, M.R.; Swanson, E.; Dillmann, W.H.:  
*„Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation.“*

J Clin Invest (1997); 100: 380-89.

Hering, D., Marusic, P., Walton, A.S., Duval, J., Lee, R., Sata, Y., Krum, H., Lambert, E., Peter, K., Head, G., Lambert, G., Esler, M.D., Schlaich, M.P.:  
*“Renal artery anatomy affects the blood pressure response to renal denervation in patients with resistant hypertension.”*

Int J Cardiol. (2015) 1;202:388-93.

Herold, G.:

*„Innere Medizin“,*

*Kapitel Kardiologie* (2012)

Hilderbrand, A., Romarís, M., Rasmussen, L.M., Heinegård, D., Twardzik, D.R., Border, W.A., Ruoslahti, E.:

*“Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta.”*

Biochem J (1994); 302: 527-34.

Holloway, T.M., Bloemberg, D., da Silva, M.L., Simpson, J.A., Quadrilatero, J., Spriet, L.L.:

*“High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats.”*

PLoS One (2015); 10(3): 0121138.

Hu, B., Wu, Y.M.; Wu, Z.; Phan, S.H.:

*“Nkx2.5/Csx represses myofibroblast differentiation.”*

Am J Respir Cell Mol Biol (2010); 42(2): 218-26.

Ikeda, Y.; Hiroi, Y.; Hosoda, T.; Utsunomiya, T.; Matsuo, S.; Ito, T.; Inoue, J.; Sumiyoshi, T.; Takano, H.; Nagai, R.; Komuro, I.:

*“Novel point mutation in the cardiac transcription factor CSX/NKX2.5 associated with congenital heart disease.”*

Circ J (2002); 66(6): 561-3.

Karaca, M.; Coban, E.; Ozdem, S.; Unal, M.; Salim, O.; Yucel, O.:

*“The association between endothelial dysfunction and hypertensive retinopathy in essential hypertension.”*

Med Sci Monit. (2014); 20: 78-82.

Kawaguchi, H.; Kitabatake, A.:

*“Renin-angiotensin system in failing heart.”*

J Mol Cell Cardiol (1995); 27(1): 201-9.

Kontaraki, J.E., Marketou, M.E., Zacharis, E.A., Parthenakis, F.I., Vardas, P.E.:

*“Early cardiac gene transcript levels in peripheral blood mononuclear cells in patients with untreated essential hypertension.”*

J Hypertens (2011); 29(4): 791-7.

Lambert, G.W., Hering, D., Marusic, P., Thorp, A., Sata, Y., Lee, R., Duval, J., Hammond, L., Head, G.A., Esler, M.D., Lambert, E.A., Dixon, J.B., Dhar, A.K., Barton, D.A., Schlaich, M.P.:

*“Health-related quality of life and blood pressure 12 months after renal denervation.”*

J Hypertens. 2015 Nov;33(11):2350-8.

Levick, S.P., Meléndez, G.C., Plante, E., McLarty, J.L., Brower, G.L., Janicki, J.S.:

*“Cardiac mast cells: the centrepiece in adverse myocardial remodelling.”*

Cardiovasc Res (2011); 89(1): 12-9.

Liang, Q., De Windt, L.J., Witt, S.A., Kimball, T.R., Markham, B.E., Molkentin, J.D.:

*“The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo.”*

J Biol Chem. (2001): 276(32): 30245-53.

Li, H.; Zuo, S.; He, Z.; Yang, Y.; Pasha, Z.; Wang, Y.; Xu, M.:

*„Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival.”*

Am J Physiol Heart Circ Physiol (2010); 299(6): 1772-81.



Li, J.; Jubair, S.; Janicki, J.S.:

*„Estrogen inhibits mast cell chymase release to prevent pressure overload-induced adverse cardiac remodeling.“*

Hypertension (2015); 65(2): 328-34.

Liu, N.; Tian, J.; Cheng, J.; Zhang, J.:

*„Migration of CXCR4 gene-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the acute injured kidney.“*

J Cell Biochem (2013); 114(12): 2677-89.

Lijnen, P.J.; Petrov, V.V.; Fagard, R.H.:

*“Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1).“*

Mol Genet Metab (2000); 71(1-2): 418-35.

Lijnen, P.J. und Petrov, V.V.:

*„Role of intracardiac renin-angiotensin-aldosterone system in extracellular matrix remodeling.“*

Methods Find Exp Clin Pharmacol (2003); 25(7): 541-64.

Locatelli, J.; Monteiro de Assis, L.V.; Morais Araújo, C.; Carvalho Alzamora, A.;

Campagnole-Santos, M.J.; Augusto dos Santos, R.; Isoldi, M.C.:

*“Swimming training promotes cardiac remodeling and alters the expression of mRNA and protein levels involved in calcium handling in hypertensive rats.“*

Life Sci (2014); 117(2): 67-74.

Lu, L., Mei, D.F., Gu, A.G., Wang, S., Lentzner, B., Gutstein, D.E., Zwas, D., Homma, S., Yi, G.H., Wang, J.:

*“Exercise training normalizes altered calcium-handling proteins during development of heart failure.“*

J Appl Physiol (2002); 92(4):1524-30.

Ma, Z.Y.; Zhao, Y.C.:

*“Effects of aerobic exercise training on antihypertension and expressions of VEGF, eNOS of skeletal muscle in spontaneous hypertensive rats.“*

Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi (2014); 30(4): 320-4.

Magga, J.; Kalliovalkama, J.; Romppanen, H.; Vuolteenaho, O.; Pörsti, I.; Kähönen, M.; Tolvanen, J.P.; Ruskoaho, H.:

*„Differential regulation of cardiac adrenomedullin and natriuretic peptide gene expression by AT1 receptor antagonism and ACE inhibition in normotensive and hypertensive rats.”*

J Hypertens (1999); 17(11): 1543-52.

Marcus, J.A., Pothineni, A., Marcus, C.Z., Bisognano, J.D.:

*“The role of obesity and obstructive sleep apnea in the pathogenesis and treatment of resistant hypertension.”*

Curr Hypertens Rep. (2014); 16(1):411.

Maris, M.E.; Melchert, R.B.; Joseph, J.; Kennedy, R.H.:

*“Gender differences in blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats.”*

Clin Exp Pharmacol Physiol (2005); 32(1): 35-9.

Matsumoto, S., Kobayashi, T., Katoh, M., Saito, S., Ikeda, Y., Kobori, M., Masuho, Y., Watanabe, T.:

*“Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits: relationship to lesion development.”*

Am J Pathol. (1998); 153(1):109-19.

McCullagh, B.N.; Costello, C.M.; Li, L.; O'Connell, C.; Codd, M.; Lawrie, A.; Morton, A.; Kiely, D.G.; Condliffe, R.; Elliot, C.; McLoughlin, P.; Gaine, S.:

*“Elevated Plasma CXCL12 $\alpha$  Is Associated with a Poorer Prognosis in Pulmonary Arterial Hypertension.”*

PLoS One (2015); 10(4): e0123709.

McCulloch, B.:

*“Heart Failure and Atrial Fibrillation.”*

Crit Care Nurs Clin North Am. (2015); 27(4):427-38.

Mieno, S., Ramlawi, B., Boodhwani, M., Clements, R.T., Minamimura, K., Maki, T., Xu, S.H., Bianchi, C., Li, J., Sellke, F.W.:

*“Role of stromal-derived factor-1alpha in the induction of circulating CD34+CXCR4+ progenitor cells after cardiac surgery.”*

Circulation (2006); 111(1): 186-92.

Mogensen, C.E.:

*„New treatment guidelines for a patient with diabetes and hypertension.“*;

J Hypertens Suppl. (2003); 21(1): 25-30.

Morin, S.; Charron, F.; Robitaille, L.; Nemer, M.:

*“GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters.”*

EMBO J (2000); 19(9): 2045-55.

Motz W.:

*“Arterial hypertension, left ventricular hypertrophy, and ventricular arrhythmias.”*

Herzschrittmacherther Elektrophysiol. (2006);17(4):218-20.

Nakanishi, K.; Tajima, F.; Itoh, H.; Nakata, Y.; Osada, H.; Hama, N.; Nakagawa, O.; Nakao, K.; Kawai, T.; Takishima, K.; Aurues, T.; Ikeda, T.:

*“Changes in atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide associated with hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats.”*

Virchows Arch. (2001); 439(6): 808-17.

Navar, L.G.:

*“Translational studies on augmentation of intratubular renin-angiotensin system in hypertension.”*

Kidney Int Suppl (2011).3(4):321-325.

Oka, T., Maillet, M., Watt, A.J., Schwartz, R.J., Aronow, B.J., Duncan, S.A., Molkenin, J.D.:

*“Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability.”*

Circ Res. (2006) ;98(6):837-45.

Orlic, D.; Hill, J.M.; Arai, A.E.:

*“Stem cells for myocardial regeneration.”*

Circ Res (2002); 91(12): 1092-102.

Pagan, L.U., Damatto, R.L., Cezar, M.D., Lima, A.R., Bonomo, C., Campos, D.H.,  
Gomes, M.J., Martinez, P.F., Oliveira, S.A. Jr., Gimenes, R., Rosa, C.M., Guizoni,  
D.M., Moukbel, Y.C., Cicogna, A.C., Okoshi, M.P., Okoshi, K.:

*„Long-term low intensity physical exercise attenuates heart failure development in  
aging spontaneously hypertensive rats.”*

Cell Physiol Biochem (2015); 36(1): 61-74.

Panagopoulou, V.; Deftereos, S.; Kossyvakis, C.; Raisakis, K.; Giannopoulos, G.;  
Bouras, G.; Pyrgakis, V.; Cleman, M.W.:

*“NTproBNP: an important biomarker in cardiac diseases.”*

Curr Top Med Chem (2013); 13(2): 82-90.

Pedram, A.; Razandi M.; Narayanan, R.; Dalton, J.T.; McKinsey, T.A.; Levin E.R.:

*“Estrogen regulates histone deacetylases to prevent cardiac hypertrophy.”*

Mol Biol Cell (2013); 24(24): 3805-18.

Peng, Y.X., Shan, J., Qi, X.Y., Zhang, S.J., Ma, S.P., Wang, N., Li, J.P., Xue, H., Wu,  
M.:

*“The catecholamine-beta-adrenoreceptor-cAMP system and prediction of  
cardiovascular events in hypertension.”*

Clin Exp Pharmacol Physiol. (2006); 33(3):227-31.

Periasamy, M.; Bhupathy, P.; Babu, G.J.:

*“Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase pump expression and its  
relevance to cardiac muscle physiology and pathology.”*

Cardiovasc Res (2008); 77(2): 265-73.

Phan, D.G., Dreyfuss-Tubiana, C., Blacher, J.:

*“Hypertensive emergencies and urgencies.”*

Presse Med. (2015); 44(7-8):737-44.

Phillips, C.L., Cistulli, P.A.:

*“Obstructive sleep apnea and hypertension: epidemiology, mechanisms and treatment effects.”*

Minerva Med. (2006); 97(4):299-312.

Plotnikova, I.V., Kovalev, I.A., Suslova, T.E., Bezliak, V.V.:

*“Correlation of Endothelial Dysfunction With Course of Essential Arterial Hypertension in Adolescence.”*

Kardiologiya. (2015);55(3):21-6.

Radin, M.J.; Holycross, B.J.; Sharkey, L.C.; Shiry, L.; McCune, S.A.:

*“Gender modulates activation of renin-angiotensin and endothelin systems in hypertension and heart failure.”*

J Appl Physiol (2002); 92(3): 935-40.

Raizada, V.; Thakore, K.; Luo, W.; McGuire, P.G.:

*“Cardiac chamber-specific alterations of ANP and BNP expression with advancing age and with systemic hypertension.”*

Mol Cell Biochem (2001); 16(1-2): 137-40.

Reid, C.M.; Dart A.M.; Dewar, E.M.; Jennings, G.L.:

*“Interactions between the effects of exercise and weight loss on risk factors, cardiovascular haemodynamics and left ventricular structure in overweight subjects.”*

J Hypertens (1994); 12(3): 291-301.

Rorive, G., Carlier, P., Smelten, N., Zgheib, A.:

*“Sympatholytic drugs and cardiac remodelling in human and experimental arterial hypertension.”*

Basic Res Cardiol. (1991); 86 Suppl 1:141-8.

Rosenkranz, S.:

*“TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling.”*

Cardiovasc Res (2004); 63(3): 423-32.

Rumboldt, Z.; Marinkovic, M.; Drinovec, J.:

*“Enalapril versus captopril: a double-blind multicentre comparison in essential hypertension.”*

Int J Clin Pharmacol Res. (1988); 8(3): 181-8.

Sacks, F.M., Svetkey, L.P., Vollmer, W.M., Appel, L.J., Bray, G.A., Harsha, D., Obarzanek, E., Conlin, P.R., Miller, E.R. 3rd, Simons-Morton, D.G., Karanja, N., Lin, P.H.:

*“Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet.”*

N Engl J Med. (2001); 344(1):3-10.

Sakata, Y.; Yamamoto, K.; Masuyama, T.; Mano, T.; Nishikawa, N.; Kuzuya, T.; Miwa, T.; Hori, M.:

*“Ventricular production of natriuretic peptides and ventricular structural remodeling in hypertensive heart failure.”*

J Hypertens (2001); 19(10): 1905-12.

Sato, S., Carcel, C., Anderson, C.S.:

*“Blood Pressure Management After Intracerebral Hemorrhage”.*

Curr Treat Options Neurol. 2015 Dec;17(12):49.

Satou, R., Shao, W., Navar, L.G.:

*“Role of stimulated intrarenal angiotensinogen in hypertension.”*

Ther Adv Cardiovasc Dis. 2015 Aug;9(4):181-90.

Savai, R.; Pullamsetti, S.S.; Kolbe, J.; Bieniek, E.; Voswinckel, R.; Fink, L.; Scheed, A.; Ritter, C.; Dahal, B.K.; Vater, A.; Klussmann, S.; Ghofrani, H.A.; Weissmann, N.; Klepetko, W.; Banat, G.A.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Schermuly, R.T.:

*“Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension.”*

Am J Respir Crit Care Med (2012); 186(9): 897-908.

Schlüter K.-D., Frischkopf, K., Flesch, M., Rosenkranz, S., Taimor, G., Piper, H.M.:

*“Central role for ornithine decarboxylase in beta-adrenoceptor mediated hypertrophy.”*

Cardiovasc Res. (2000); 45(2): 407-10.

Schlüter, K.-D.; Frischkopf, K.; Flesch, M.; Rosenkranz, S.; Taimor, G.; Piper H.M.:  
*„Mechanisms that regulate homing function of progenitor cells in myocardial infarction.“*  
Minerva Cardioangiol (2009); 57(2): 203-17.

Schuh, A.; Kroh, A.; Konschalla, S.; Liehn, E.A.; Sobota, R.M.; Biessen, E.A.; Bot, I.;  
Sönmez, T.T.; Schober, A.; Marx, N.; Weber, C.; Sasse, A.:  
*“Myocardial regeneration by transplantation of modified endothelial progenitor cells  
expressing SDF-1 in a rat model.”*  
J Cell Mol Med (2012); 16(10): 2311-20.

Schultz, R.L., Swallow, J.G., Waters, R.P., Kuzman, J.A., Redetzke, R., A., Said, S.,  
Escobar, G.M., Gerdes, A.M.:  
*“Effects of excessive long-term exercise on cardiac function and myocyte remodelling  
in hypertensive heart failure rats.”*  
Hypertension 50 (2007); 410-16.

Shen, L.; Gao, Y.; Qian, J.; Sun, A.; Ge, J.:  
*„A novel mechanism for endothelial progenitor cells homing: The SDF-1/CXCR4-Rac  
pathway may regulate endothelial progenitor cells homing through cellular polarization.“*  
Med Hypotheses (2011); 76(2): 256-8.

Skrzypczyk, P.; Roszkowska-Blaim, M.; Daniel, M.:  
*“Hypertensive crisis in children and adolescents.”*  
Merkur Lekarski (2013); 35(210): 379-84.

Stamler, J.:  
*“Blood pressure and high blood pressure. Aspects of risk.”*  
Hypertension (1991); 18(3): 95-107.

Statistisches Bundesamt: Homepage [www.destatis.de](http://www.destatis.de)

Sugizaki, M.M.; Leopoldo, A.P.; Conde, S.J.; Campos, D.S.; Damato, R.; Leopoldo,  
A.S.; Nascimento, A.F.; Oliveira Júnior Sde, A.; Cicogna, A.C.:  
*“Upregulation of mRNA myocardium calcium handling in rats submitted to exercise and  
food restriction.”*  
Arg Bras Cardiol (2011); 97(1): 46-52.

Sultana, R., Sultana, N., Rashid, A., Rasheed, S.Z., Ahmed, M., Ishaq, M., Samad, A.:  
*“Cardiac arrhythmias and left ventricular hypertrophy in systemic hypertension.”*

J Ayub Med Coll Abbottabad. (2010); 22(4):155-8.

Susic, D., Varagic, J., Ahn, J., Matavelli, L., Frohlich, E.D.:

*„Long-term mineralocorticoid receptor blockade reduces fibrosis and improves cardiac performance and coronary hemodynamics in elderly SHR.”*

Am J Physiol Heart Circ Physiol (2007); 292(1): 175-9.

Takeo, S.; Nasa, Y.; Tanonaka, K.; Yamaguchi, F.; Yabe, K.; Hayashi, H.; Dhalla, N.S.:  
*“Role of cardiac renin-angiotensin system in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in the ischemic-reperfused heart.”*

Mol Cell Biochem (2000); 212(1-2): 227-35.

Tanaka, M.; Chen, Z.; Bartunkova, S.; Yamasaki, N.; Izumo, S.:

*“The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development.”*

Development (1999); 126(6): 1269-80.

Teicher, B.A.; Fricker, S.P.:

*„CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer.”*

Clin Cancer Res (2010); 16(11): 2927-31.

Theiss, H.D.; Vallaster, M.; Rischpler, C.; Krieg, L.; Zaruba, M.M.; Brunner, S.;

Vanchev, Y.; Fischer, R.; Gröbner, M.; Huber, B.; Wollenweber, T.; Assmann, G.;

Mueller-Hoecker, J.; Hacker, M.; Franz, W.M.:

*“Dual stem cell therapy after myocardial infarction acts specifically by enhanced homing via the SDF-1/CXCR4 axis.”*

Stem Cell Res (2011); 7(3): 244-55.

Thomas, R.M., Ruel, E., Shantavasinkul, P.C., Corsino, L.:

*“Endocrine hypertension: An overview on the current etiopathogenesis and management options.”*

World J Hypertens. (2015); 5(2):14-27.



Turin, T.C., Okamura, T., Afzal, A.R., Rumana, N., Watanabe, M., Higashiyama, A., Nakao, Y., Nakai, M., Takegami, M., Nishimura, K., Kokubo, Y., Okayama, A., Miyamoto, Y.:

*“Hypertension and lifetime risk of stroke.”*

J Hypertens. (2015) (7).

Velasco, A., Vongpatanasin, W.:

*“The evaluation and treatment of endocrine forms of hypertension.”*

Curr Cardiol Rep. (2014); 16(9):528.

Wan, X.; Xia, W.; Gendoo, Y.; Chen, W.; Sun, W.; Sun, D.; Cao, C.:

*„Upregulation of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) is associated with macrophage infiltration in renal ischemia-reperfusion injury.”*

PLoS One (2014); 9(12): e114564.

Wang, X.C.; Liu, C.H.; Chen, Y.J.; , Wu, Y.; Yang, L.S.; Liu, H.M.; Liao, H.L.:

*„Clinical and pathological analysis of the kidney in patients with hypertensive nephropathy.”*

Exp Ther Med (2013); 6(5): 1243-1246.

Wang, Y.; Luther, K.:

*„Genetically manipulated progenitor/stem cells restore function to the infarcted heart via the SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 signaling pathway.”*

Prog Mol Biol Transl Sci (2012); 111: 265-84.

Watanabe, N.; Ikeda, U.:

*„Matrix metalloproteinases and atherosclerosis.”*

Curr Atheroscler Rep (2004); 6(2): 112-20.

Werner, L., Guzman-Gur, H., Dotan, I.:

*“Involvement of CXCR4/CXCR7/CXCL12 Interactions in Inflammatory bowel disease.”*

Theranostics (2013); 3(1): 40-6.

World Health Organisation (WHO): Homepage [www.who.int](http://www.who.int)

Wojakowski, W., Kucia, M., Liu, R., Zuba-Surma, E., Jadczyk, T., Bachowski, R., Nabialek, E., Kaźmierski, M., Ratajczak, M.Z., Tendera, M.:

*“Circulating very small embryonic-like stem cells in cardiovascular disease.”*

J Cardiovasc Transl Res. (2011); 4(2):138-44.

Wollert, K.C.; Drexler, H.:

*„The renin-angiotensin system and experimental heart failure.”*

Cardiovas Res (1999); 43(4): 838-49.

Wruster, T. Stellos, K., Haap, M., Seizer, P., Geisler, T., Otton, J., Indermuehle, A., Ishida, M., Schuster, A., Nagel, E., Gawaz, M., Bigalke, B.:

*“Platelet expression of stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1): an indicator for ACS?”*

Int J Cardiol (2013); 164(1): 111-5.

Woodiwiss, A.J., Norton, G.R.:

*“Obesity and left ventricular hypertrophy: the hypertension connection.”*

Curr Hypertens Rep. (2015); 17(4):539.

Xu, M.; Millard, R.W.; Ashraf, M.:

*“Role of GATA-4 in differentiation and survival of bone marrow mesenchymal stem cells.”*

Prog Mol Biol Transl Sci (2012); 111: 217-41.

Yang, T.; Li, Z.N.; Chen, G.; Gu, Q.; Ni, X.H.; Zhao, Z.H.; Ye, J.; Meng, X.M.; Liu, Z.H.; Xiong, C.M.; He, J.G.:

*“Increased levels of plasma CXC-Chemokine Ligand 10, 12 and 16 are associated with right ventricular function in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension.”*

Heart Lung (2014); 43(4): 322-7.

Yamaguchi, J.; Kusano, K.F.; Masuo, O.; Kawamoto, A.; Silver, M.; Murasawa, S.; Bosch-Marce, M.; Masuda, H.; Losordo, D.W.; Isner, J.M.; Asahara, T.:

*“Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization.”*

Circulation (2003); 107(9): 1322-8.

Yen, T.T., Yu, P.L., Roeder, H., Willard, P.W.:

*“A genetic study of hypertension in Okamoto-Aoki spontaneously hypertensive rats.”*

Heredity (1974); 33: 309-316.

Yu, G., Liang, X., Xie, X., Yang, T., Sun, M., Zhao, S.:

*“Apoptosis, myocardial fibrosis and angiotensin II in the left ventricle of hypertensive rats treated with fosinopril or losartan.”*

Chin Med J (.2002);115(9):1287-91.

Yu, L.; Hales, C.A.:

*„Effect of chemokine receptor CXCR4 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in rats.”*

Respir Res (2011); 12: 21.

Zhang, L., Tian, W., Feng, R., Song, C., Zhao, Z., Bao, J., Liu, A., Su, D., Zhou, J., Jing, Z.:

*“Prognostic Impact of Blood Pressure Variability on Aortic Dissection Patients After Endovascular Therapy.”*

Medicine (Baltimore). (2015); 94(38):e1591.

Zidek, W.; Tepel, M.; van der Giet, M.:

*“Medical treatment of hypertension--what treatment for what patients?”*

MMW Fortschr Med (2004); 146(22): 31-4.

Zuk, A.; Gershenovich, M.; Ivanova, Y.; MacFarland, R.T.; Fricker, S.P.; Ledbetter, S.:

*„CXCR<sub>4</sub> antagonism as a therapeutic approach to prevent acute kidney injury.”*

Am J Physiol Renal Physiol (2014); 307(7).

---

## 10. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 11. Veröffentlichung

Vortrag:

C. Sonntag, R. Schreckenber, K.-D. Schlüter

*„Cell recruitment via the SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 axis in hypertensive heart disease.“*

ESC Kongress Amsterdam (2013)

## 12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter für die großartige Betreuung. Dies beinhaltet sowohl die wissenschaftliche Beratung, als auch fachliche Unterstützung und die angenehme Atmosphäre.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Rolf Schreckenbergr für die kompetente Beratung.

Ein großes Lob gilt den technischen Mitarbeitern, Frau Nadine Woitasky und Herrn Peter Volk, die maßgeblich an der korrekten Durchführung der Versuche beteiligt waren.

Weiteren danke ich allen Doktoranden und PhD-Studenten, die zur gleichen Zeit ihre Arbeit vervollständigt und zu einem wünschenswerten Arbeitsklima beigetragen haben.

Ein unaussprechlicher Dank gilt meiner Familie.

Für ihre Unterstützung in jeder Lebenslage.

Doch in diesem Falle ganz besonders für Fachgespräche und Diskussionen, für die Korrektur und den seelischen Beistand.

Ihr seid die Besten.



